

A gyulladáshoz köthető jelátviteli utak fokozott aktivitása antraciklin-paklitaxel rezisztens emlőkarcinómákban

MENYHÁRT OTÍLIA^{1,2}, FEKETE JÁNOS TIBOR^{1,2}, GYÖRFFY BALÁZS^{1,2}

¹Semmelweis Egyetem, Bioinformatikai Tanszék, ²ELKH-TTK, Enzimológiai Intézet, Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Budapest

A jelen munka az NKFIH által biztosított PharmaLab, RRF-2.3.1-21-2022-00015 pályázat támogatásával valósult meg.

Levelezési cím:

Prof. Dr. Györfy Balázs, Semmelweis Egyetem,
Bioinformatikai Tanszék, 1094 Budapest, Tűzoltó u. 7-9.,
e-mail: gyorffy.balazs@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2023. június 2.

Elfogadva:

2023. szeptember 7.

Az emlődaganatok kezelésére leggyakrabban az antraciklin és taxán kombinációját tartalmazó szisztémás terápia ajánlott, azonban a betegek mintegy 30%-ánál kiújulás tapasztalható. Jelen tanulmányunkban az antraciklin-paklitaxel kezeléssel szembeni rezisztencia mechanizmusait vizsgáltuk a műtétkor gyűjtött tumormintákból származó génexpressziós mintázatok és a későbbi terápiás válaszok alapján. A relapsusmentes túlélés (RFS) vizsgálatára 187 betegen alapuló adatbázist készítettünk, mely 10017 gén vizsgálatát tette lehetővé. A betegeket a hatvan hónapnál korábban kialakuló relapszus alapján reagálók/nem reagálók kategóriákba soroltuk, majd a két csoport között Mann-Whitney U-tesztel hasonlítottuk össze minden gén expresszióját. A statisztikai szignifikancia küszöbét $p < 0,05$ és $\geq 1,44$ -es FC-értékhez állítottuk be. Összesen 51 felszabályozott gént azonosítottunk a nem reagáló betegcsoportban, melyek főként a gyulladásos folyamatokban és a veleszületett immunválasz kialakításában játszanak szerepet. Az SLC7A5 aminosav-transzportert kódoló gén magas expressziója szignifikáns összefüggést mutatott a rosszabb teljes túléléssel ($p = 2,3E-10$), emelkedő expressziót mutatva tumorokban ($p = 2,94E-20$) és metasztázisokban is ($p = 1,33E-10$). Eredményeink hangsúlyozzák a tumormetabolizmus és mikrokörnyezet szerveződésének fontosságát a terápiával szembeni rezisztencia kialakulásában, mely elősegítheti a betegek osztályozását és a kezelés szempontjából releváns célpontok azonosítását. *Magy Onkol* 67:203–212, 2023

Kulcsszavak: antraciklin, paklitaxel, rezisztencia, gyulladás, veleszületett immunválasz

A frequently recommended systemic therapy for breast cancer involves a combination of anthracyclines and taxanes, however, approximately 30% of patients experience recurrence. We aimed to investigate the mechanisms of resistance to anthracycline-paclitaxel based treatment by analyzing gene expression patterns in tumor samples collected during surgery and subsequent therapeutic responses. A database of 187 patients with information about relapse-free survival (RFS) allowed the analysis of 10,017 genes. Patients were divided into responders and non-responders based on whether relapse occurred within sixty months. The expression of each gene was compared between the two groups using the Mann-Whitney U-test, with a statistical significance set at $p < 0.05$ and fold change (FC) ≥ 1.44 . We identified 51 up-regulated genes among non-responders, primarily associated with inflammatory processes and the innate immune response. The high expression of SLC7A5, encoding an amino acid transporter, was linked to worse overall survival ($p = 2.3E-10$), with elevated expression in tumors ($p = 2.94E-20$), and further increase in metastases ($p = 1.33E-10$). Our results emphasize the significance of tumor microenvironment and metabolism in therapy resistance. These findings may allow better patient classification and identification of relevant treatment targets.

Menyhárt O, Fekete JT, Györfy B. Increased activity of inflammation-related signaling pathways in anthracycline-paclitaxel resistant breast carcinomas. Magy Onkol 67:203–212, 2023

Keywords: anthracyclin, paclitaxel, resistance, inflammation, innate immune response

BEVEZETÉS

Az emlő rosszindulatú daganatos elváltozása a nőket érintő, leggyakrabban előforduló rákos megbetegedés: 2020-ban világszerte 2,3 millió női emlőrákot diagnosztizáltak, és 685 000 páciens hunyt el a betegség miatt [1]. Az emlőrák nőknél a tüdőrák utáni második leggyakoribb rosszindulatú tumoros halálozási ok, és világszerte több életévet veszítenek a nők az emlődaganatok következtében, mint bármely más ráktípus miatt [2]. Az incidencia, különösen az ösztrogénreceptor-pozitív altípus előfordulása enyhe, 0,5%-os emelkedést mutat évente, főként a nyugati civilizáció országaiban, mely a megváltozott étrendhez köthető fokozott elhízással, illetve a fogamzásgátlók használatával magyarázható [3]. A mortalitás az 1980-as évek óta folyamatosan csökken, és a betegség korai stádiumú diagnózisa esetén az 5 éves túlélés 90% [4].

Mind a neoadjuváns, mind az adjuváns kemoterápiával történő kezelés javítja a hosszú távú túlélés valószínűségét és csökkenti az emlődaganat kiújulásának kockázatát. A terápia megválasztása a daganat jellegétől, a különböző kockázati tényezőktől, a beteg általános állapotától és társbetegségeitől függ. Nincs világszerte egységes, standard kemoterápiás kezelési protokoll, azonban legtöbbször az antraciklint és taxánt tartalmazó kombinációs terápiákat tekintik a leginkább optimális kezelésnek a korai stádiumú, illetve a magas kockázatú emlődaganatok esetében [5]. A 2012-es Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) metaanalízise alapján az antraciklinalapú kezelési sémák hasonló vagy jobb kimenetelű túlélési eredményeket produkáltak a történelmileg standard kezelésnek számító CMF-hez (ciklofoszfamid, metotrexát, fluorouracil) képest, és az antraciklinalapú kezeléshez adott taxán tovább javította az eredményeket az emlőrák-specifikus halálozási arány és a 10 éves összhalálozás tekintetében [5]. Egy újonnan közzétett EBCTCG metaanalízisben az antraciklint is tartalmazó taxánkezelés csökkentette a kiújulás arányát az antraciklin nélküli taxánkezeléshez képest, és a legnagyobb előnyöket akkor figyelték meg, amikor a docetaxel plusz ciklofoszfamidhez egyidejűleg antraciklint adtak, szemben az azonos dózisú docetaxel plusz ciklofoszfamiddal (12 vs. 21 százalék), mely az emlőrák okozta halálozás 4,2 százalékos [95% CI 0,4–8,1] 10 éves csökkenéséhez vezetett [6]. A taxánok antraciklintartalmú kemoterápiához történő adása ugyancsak csökkentette a kiújulás, az emlőrák miatti halálozás és a teljes halálozás kockázatát. Azokban a vizsgálatokban, amelyekben a kontrollkarban ugyanannyi antraciklinciklust alkalmaztak, mint a kísérleti (antraciklint követő taxán) karban (n = 11 167), a taxánok beépítése a kiújulás 10 éves kockázatát 39-ről 36%-ra, az emlőrák miatti halálozás kockázatát pedig 28-ről 24%-ra csökkentette [6]. A taxán plusz antraciklin kombináció esetében a kiújulás arányos csökkenése hasonló volt az ösztrogénreceptor-pozitív és -negatív daganatok esetében, és nem különbözött az életkor, a nyirokcsomóstatusz, a tumor mérete vagy grádusa szerint, azonban a nagyobb

kumulatív dózisú és a nagyobb dózisintenzitású kezelési sémák hatékonyabbnak bizonyultak [6].

Az antraciklinek hatékonysága több hatásmechanizmussal magyarázható: a DNS-be interkalálódva, a DNS-lánc megszakítását követően stabilizálják a topoizomeráz II komplexet, megakadályozva a DNS kettős lánc újbóli összeforrását, mely leállítja a replikáció folyamatát. Ezenfelül a szabad gyökök képződésén keresztül is elősegítik a citotoxicitást, valamint előidézik a kromatinból történő hisztonkilökődést, melynek hatására az epigenom és transzkriptom deregulálódik [7]. Összességében az antraciklinkezelés visszafordíthatatlan DNS-károsodást, oxidatív stresszt és apoptotikus sejthalált okoz. Ezzel szemben a taxánok nagy affinitással kötődnek a mikrotubulusokhoz, melyek stabilizációja megakadályozza a depolimerizációt és a metafázisban a mitotikus orsó kialakulását. Ez gátolja a mitózis előrehaladását, majd a mitotikus ellenőrző pont elhúzódo aktiválása apoptózist vált ki [8].

Az emlőrák korai felismerésében tett jelentős előrelépések, valamint a kialakulását elősegítő molekuláris mechanizmusok megértése ellenére a korai stádiumú emlőkarcinómában szenvedő betegek mintegy 30%-ában később kiújul a betegség [9]. Bár a tumorméret csökkenése alapján mért kezdeti klinikai válasz gyakori, sok esetben ez a javulás csupán időleges, egyes tumorok pedig öröklött rezisztenciát mutatnak a kezeléssel szemben. Következésképpen a betegek egy részében sem patológiai teljes válasz, sem túlélési előny nem mérhető a kemoterápiás kezelés hatására.

Az elmúlt évtizedekben számos, a kemorezisztencia kialakulásához vezető mechanizmust írtak le. Mind az antraciklinekkel, mind a taxánokkal szembeni rezisztencia kialakulásában közrejátszhat a megváltozott membrántranszport és fokozott gyógyszerkiáramlás, melyben az ATP-kötő kazetta (ABC) szupercsalád tagjai, elsősorban a multidrog-rezisztencia-asszociált fehérjék játszhatnak szerepet [10–13], melyekhez egyéb gyógyszeranyagcsere-mechanizmusok is hozzájárulhatnak [14]. Ezenkívül az antraciklinek által kiváltott citotoxicitást gátolhatja többek között a DNS-javító mechanizmusok fokozódása, a topoizomeráz II megváltozott aktivitása, mely hatással lehet az antraciklin és a topoizomeráz II közötti kötődési affinitásra, az apoptotikus jelátviteli utak változása (lásd p53 tumorszuppresszor fehérje), a megváltozott cisztein- és metioninmetabolizmus, valamint különféle genetikai mutációk jelenléte [15–17].

Mivel az antraciklin-taxán kezeléssel szembeni rezisztencia az emlőrák sikeres kezelését korlátozó egyik fő ok, a rezisztenciához vezető mechanizmusok pontosabb megértése javíthatja az emlőrák kezelési stratégiáit és ezáltal a betegek túlélését. A terápiás választ előre jelző biomarkerekre van szükség, melyek alkalmasak lehetnek a betegek osztályozására és új célzott terápiás eszközök fejlesztésére. A jelen vizsgálatban célunk a műtétkor gyűjtött betegmintákban differenciálisan expresszálandó gének azonosítása a későbbi, antraciklint és taxánt tartalmazó kezelésre adott válasz szerint elkülönített minták között. A kezelésre nem

reagáló betegek (akiknél a műtétet követő 60 hónapon belül a betegség kiújult) tumormintáinak génexpresszióját vetettük össze a kezelésre reagálókéval, mely lehetővé teszi a felszabályozott gének azonosítását a tumorban.

Eredményeink arra utalnak, hogy a betegség kiújulása összefügg a tumorban és mikrokörnyezetében jelen lévő metabolikus útvonalak és gyulladásos folyamatok aktivitásával. Az azonosított markerek hasznosak lehetnek a betegek osztályozásában, adaptálhatók más kezelésekre vagy tumortípusokra, és informatív kiindulópontot biztosíthatnak későbbi funkcionális vizsgálatokhoz.

MÓDSZEREK

Adatbázis-készítés

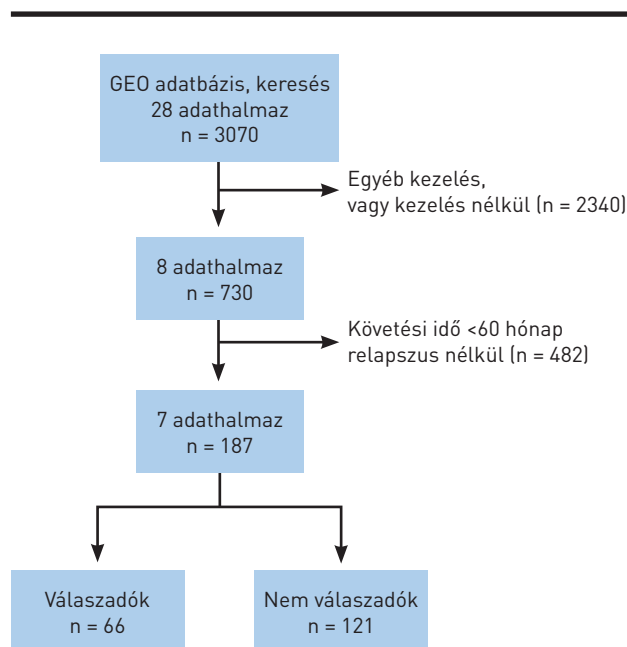
A terápiás válasz elemzésére alkalmas adatkészletek létrehozására a „breast”, „cancer”, „survival”, „GPL96”, „GPL570” és „GPL571” kulcsszavakra kerestünk a GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) adatbázisban. A felsorolt három GPL Affymetrix gén array platform azonos próbakészleteket használ a génexpresszió mérésére. Csak olyan publikációkat vettünk figyelembe, amelyekben legalább 20 beteg szerepel, a betegek kizárólag antraciklin-paklitaxel kezelést kaptak, kinyerhetők a nyers mikroarray génexpressziós adatok, valamint a kezeléssel és a kezelésre adott válasszal kapcsolatos klinikai információk. A letöltött nyers CEL-fájlokat az Affy Bioconductor könyvtár segítségével MAS5 normalizáltuk az R statisztikai környezetben (<http://www.r-project.org/>) [1. ábra] [18]. Egy skálázó normalizálást is végrehajtottunk, hogy az egyes chipen az átlagos expressziót 1000-re állítsuk be a különböző futások közötti eltérések csökkentése érdekében. JetSet szűrő alkalmazásával minden egyes génhez egyetlen próbát illesztettünk [19].

Klinikai adatok kinyerése

Minden mintához egyesével gyűjtöttük ki a klinikai adatokat, melyeket két kutató (F. J. T. és Gy. B.) validált, hogy biztosítsa az egyes betegminták klinikai jellemzőinek megbízhatóságát. A klinikai adatok segítségével megvizsgáltuk a tumormintákból származó génexpresszió és az antraciklin-paklitaxel kombinációs terápiával kezelt betegek későbbi relapszusa közötti összefüggést. A relapszusmentes túlélés (RFS>60 hónap) alapján osztottuk két csoportba (reagálók/nem reagálók) a betegeket.

A gének kiválasztásának folyamata

A relapszusmentes túlélés vizsgálatára kizárólag antraciklin-paklitaxel kombinációjával kezelt, 187 beteg mintáit tartalmazó adatbázist készítettünk a következő adatszettek felhasználásával: GSE19615, GSE25066, GSE31519, GSE65194. Ezen mintákból 22 277 db próbára vonatkozó génexpressziós információ állt rendelkezésre, amely a JetSet szűrő alkalmazását követően 10017 db egyedi gént tartalmazott. Az expressziós különbségeket minden gén esetében Mann-Whitney U-tesztrel és receiver operator characteristics (ROC) elemzés



1. ÁBRA. Az adatbázis-készítés és mintagyűjtés folyamata

segítségével hasonlítottuk össze a reagálók (relapszusmentes túlélés több mint 60 hónap) és a nem reagálók között (relapszusmentes túlélés kevesebb mint 60 hónap). A 60 hónapnál korábban cenzorált betegek az elemzésből ki voltak zárva. A statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ és Fold Change (FC) $\geq 1,44$ esetén fogadtuk el. Csak az 500 feletti átlagos expressziójú géneket fogadtuk el mint klinikailag releváns eltérést. Az elemzést R statisztikai környezetben végeztük a Bioconductor programcsomag elemeit felhasználva [20].

Génontológiai analízis

A nem reagáló betegekben felszabályozott géneket génontológiai elemzésnek vetettük alá a Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) génontológiai adatbázis 2021-es verziója segítségével [21]. A funkcionálisan kapcsolódó gének meghatározásához a több adatbázis eredményeit integráló webalapú Enrichr-t is felhasználtuk (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Az Enrichr-en belül a génlistánkhöz kapcsolódó útvonalak listáját a KEGG 2021 útvonalak opcióval határoztuk meg. Ezenfelül a Reactome 2022 adatbázis génlistái alapján szűrtük a funkcionálisan kapcsolódó géneket, ahol a Fisher egzakt teszt p -értéke 0,05 alatt volt, és az útvonalak magas kombinált pontszámmal rendelkeztek.

Túlélési eredmények vizsgálata

A kapott géneken túléléselemzést végeztünk 1877 emlődagranatos betegből származó génchipadatokat tartalmazó, valamint 1065 betegből származó, RNS-szekvenáláson alapuló génexpressziós adatbázis (KMplot.com) segítségével [22].

EREDMÉNYEK

A betegség kiújulásának vizsgálatára alkalmas adatbázis

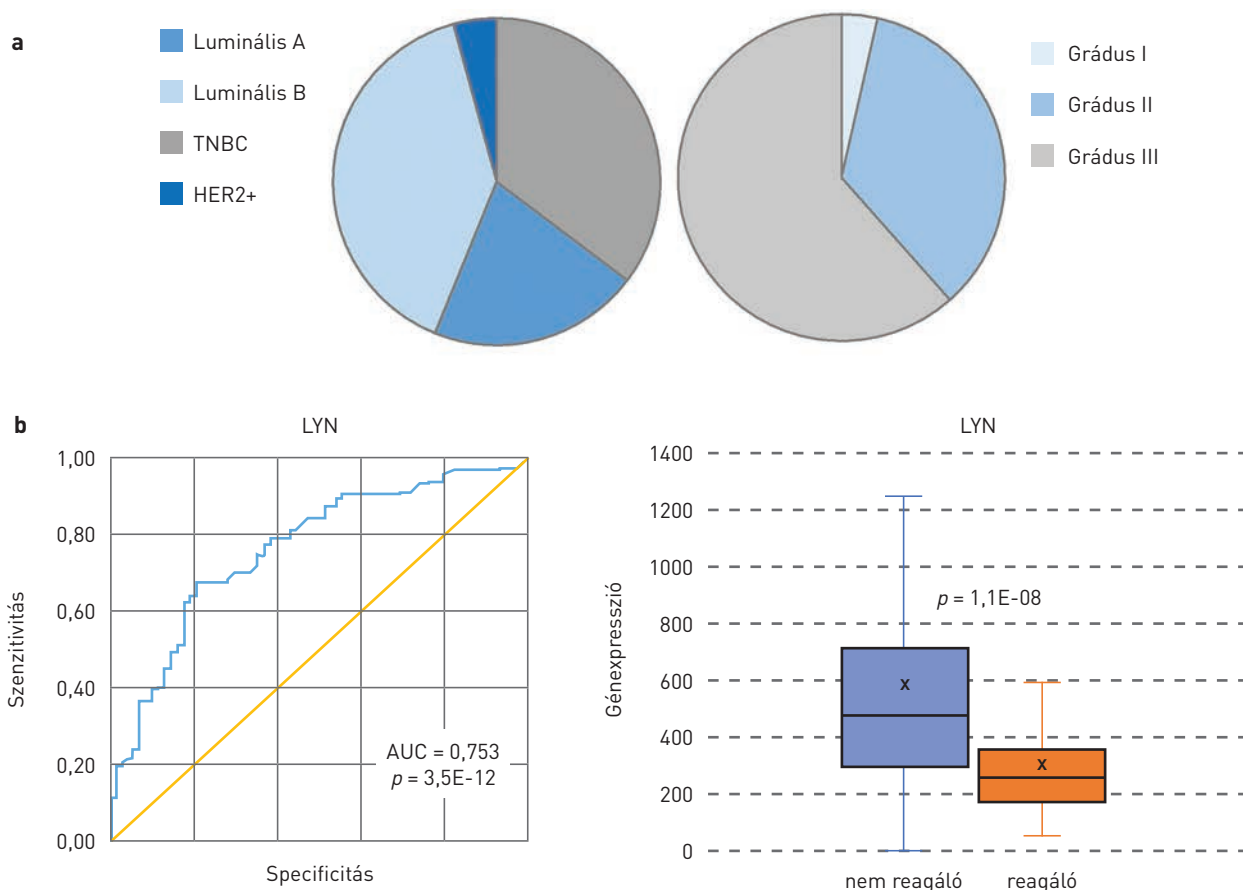
Összesen 187 emlőkarcinómás, antraciklinnel és paklitaxellel kezelt beteg adata állt rendelkezésünkre, ahol ismert a relapszusmentes túlélés hossza: az átlagos RFS 37,3 hónap (medián 27,5 hónap, max. 89,3 hónap). A kiújulás szempontjából 60 hónapnál választottuk két csoportra a betegeket, mely időszakon belül 121 esetben újult ki a daganat. A St. Gallen-i konszenzus alapján 66 beteg TNBC (35,3%), 39 lúminális A (20,9%), 74 lúminális B (39,6%) és 8 beteg (4,3%) HER2-pozitív altípus besorolást kapott (2.a ábra). 138 beteg esetében volt ismert nyirokcsomó-érintettség, míg 47 esetben nyirokcsomó-érintettséget nem diagnosztizáltak. Amennyiben ismert volt a betegség szöveti grade-je, 6 esetben 1-es grádusú, 59 esetben 2-es grádusú és 104 esetben 3-as grádusú megbetegedést azonosítottak (2.a ábra). A betegek átlagéletkora 50,6 év (medián életkor 50,4 év, legalacsonyabb 24, legmagasabb 75 év). A betegek nagy része (>90%) neoadjuváns kezelésben részesült.

A betegség kiújulásával összefüggésbe hozható gének

Összesen 51, fokozott expressziót mutató gént sikerült azonosítani azon betegek tumormintáiból, akiknél kiújulás volt tapasztalható a kezelés megkezdésétől számított 60 hónapon belül. A LYN gén magas expressziója különítette el leginkább egymástól a reagálókat/nem reagálókat (AUC = 0,753, $p = 3,5E-12$) (2.b ábra). A kapott 51 génen túléléselemzést végeztünk génchip-, valamint RNS-szekvenálási adatokon alapuló génexpressziós adatbázis (KMplot.com) segítségével (22), melynek alapján 3 gén (SLC7A5, PRAME és TMEM45A) magas expressziója mutatott szignifikáns összefüggést rosszabb teljes túléléssel (1. táblázat).

A tumorprogresszió és a génexpresszió kapcsolata

Mindhárom gén esetében összehasonlítottuk a normális, tumoros és metasztatikus szövetekben található génexpressziót a TNMplot.com segítségével (23). Az SLC7A5 gén expressziója szignifikánsan eltért a normális, tumoros és metasztatikus minták között (Kruskal-Wallis teszt,



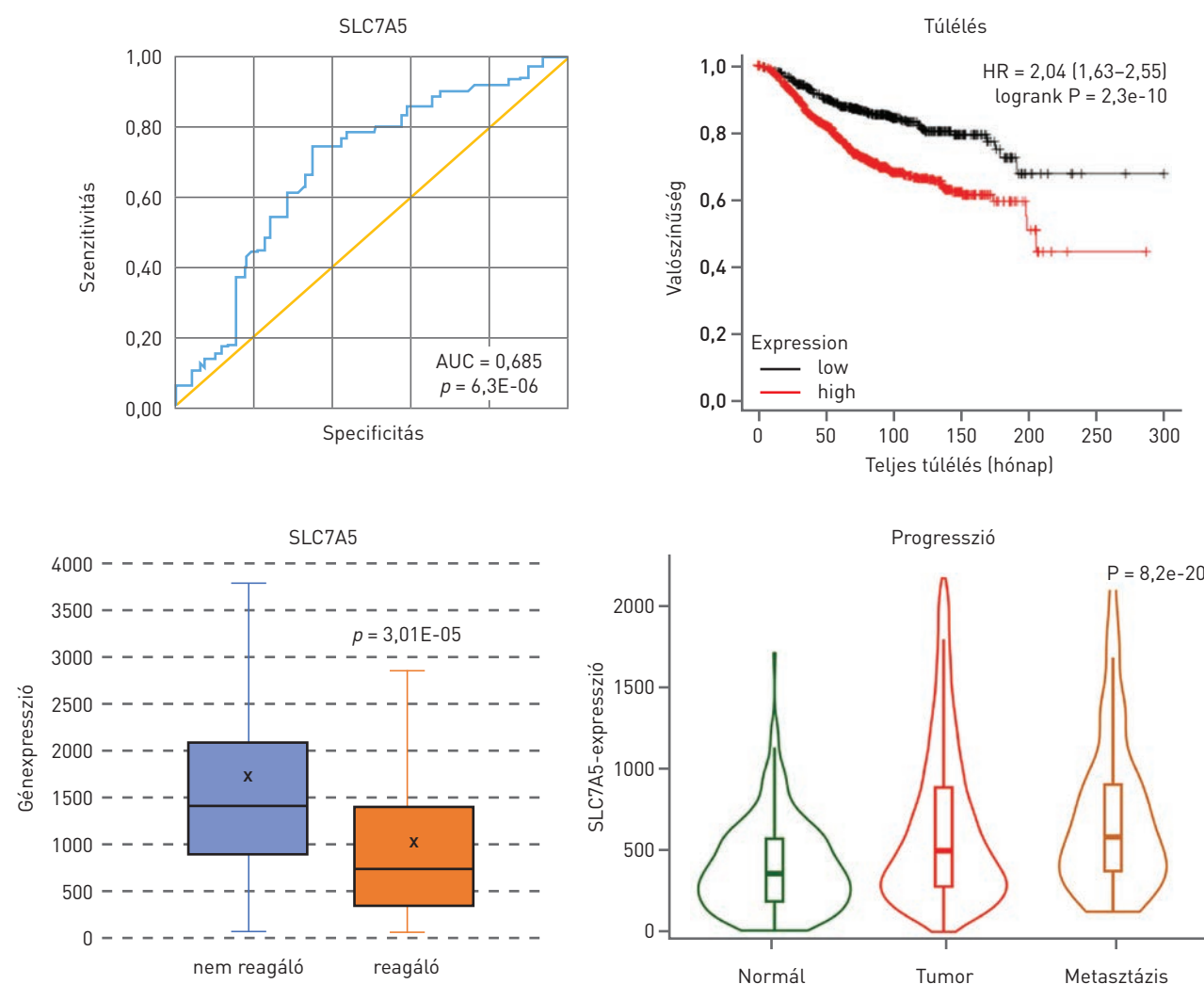
2. ÁBRA. a) Az adatbázisban szereplő 187 páciens St. Gallen-i konszenzus szerinti altípus-, illetve grádusbesorolása, b) az antraciklin-paklitaxel kombinációs terápiával kezelt emlőtumoros betegeket a relapszusmentes túlélés szempontjából a LYN gén magas expressziója különítette el legnagyobb mértékben

1. TÁBLÁZAT. A műtéttől számított 60 hónapon belül relapszusba kerülő betegek daganatában felülexpresszáldó három gén, melyek magas expressziója rosszabb teljes túléléssel társult mind génchip-, mind RNS-szekvenálásból származó adatok alapján

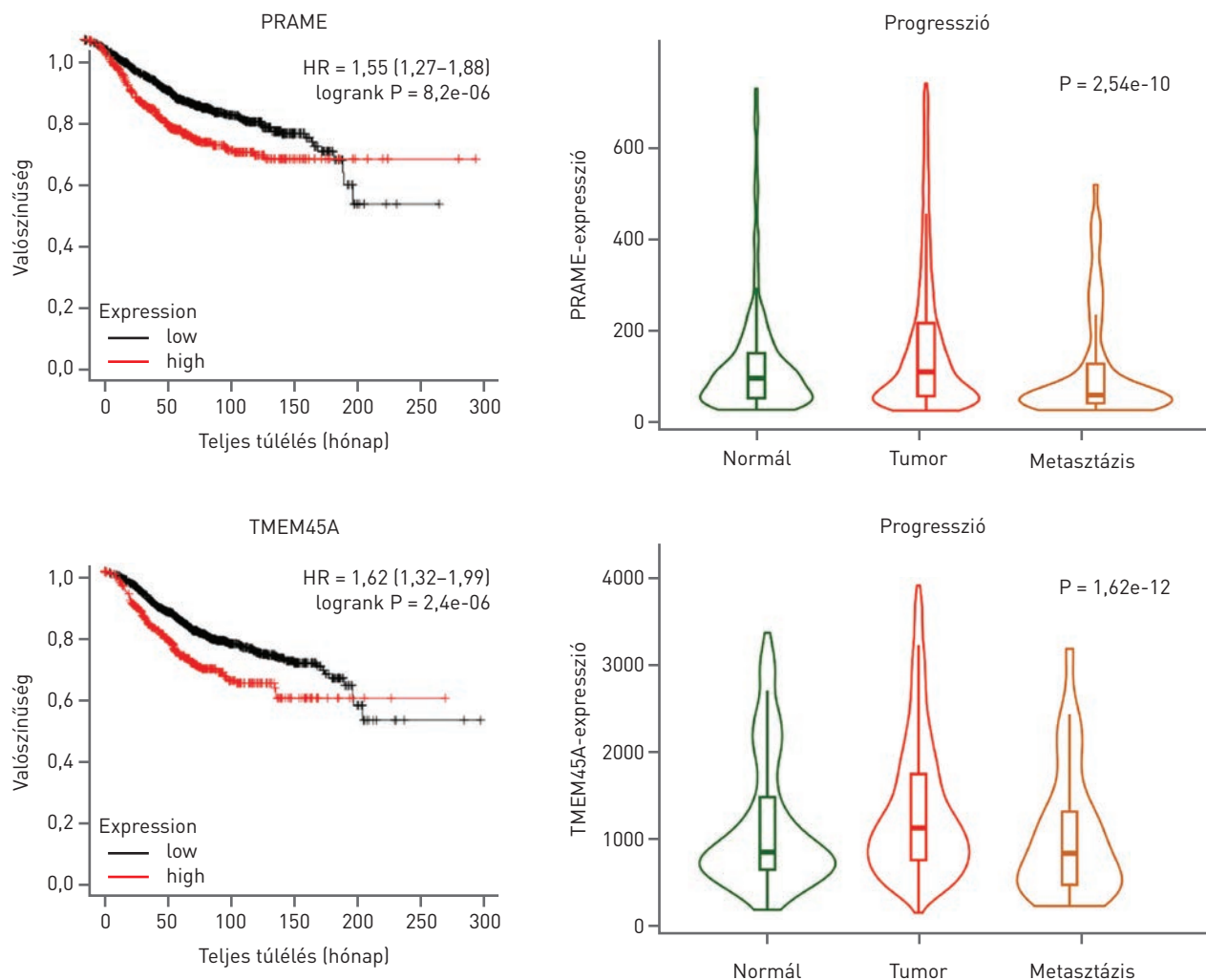
Gén neve	Átlagos exp- resszió (nem reagálók)	Átlagos expresszió (reagálók)	Fold change	Mann-Whitney p-érték	ROC AUC	ROC p-érték	Túlélés p, génchip	Túlélés p, RNS-szekve- nálás
PRAME	568,4	378,9	1,5	1,43E-05	0,692	1,50E-06	8,20E-06	3,00E-03
SLC7A5	1845,1	1073,5	1,72	3,01E-05	0,685	6,30E-06	2,30E-10	1,70E-03
TMEM45A	1912,2	815,0	2,35	8,21E-05	0,674	7,00E-06	2,40E-06	6,00E-03

$p = 8,2E-20$): magasabb expressziót találtunk a tumoros mintákban az ép szövetekhez képest ($p = 2,94E-20$), további emelkedést mutatva a metasztázisokban ($p = 1,33E-10$) (3. ábra). Bár a PRAME és TMEM45A gének esetében szignifi-

kánsan eltérő expressziót mértünk (Kruskal-Wallis teszt, PRAME $p = 2,54E-10$, TMEM45A $p = 1,62E-12$), a metasztatikus szövetben mért expresszió mértéke a tumorokhoz képest nem mutatott további emelkedést ($p > 0,1$), melyből



3. ÁBRA. Az antraciklin-paklitaxel terápiára reagálókat/nem reagálókat szignifikánsan elkülönítő SLC7A5 gén prognosztikus relevanciája génchipadatok túléléselemzése, valamint a tumoros és metasztatikus mintákban a normális szövethez képest mutatott emelkedett expresszió alapján



4. ÁBRA. A terápiára reagáló és nem reagáló betegeket elkülönítő PRAME és TMEM45A prognosztikus relevanciája génchipadatok túléléselemzése alapján. Expressziójuk szignifikánsan emelkedik a tumoros mintákban a normális szövetben mérthez képest

arra következtettünk, hogy a tumorprogresszió folyamatában az SLC7A5 gén hangsúlyosabb szerepet tölthet be (4. ábra).

A betegség kiújulása mögött álló gyulladásos folyamatok

A szignifikáns géneket tartalmazó listát több különböző génontológiai és útvonal-feldúsulási vizsgálatnak vetettük alá. A DAVID génontológiai vizsgálat alapján ezen gének a gyulladásos folyamatokban, a veleszületett immunválasz kialakításában és a toll-like receptor 4 jelátviteli útvonal működésében játszanak szerepet (FDR<13%) (2. táblázat). Az ezekhez a funkciókhoz rendelt LYN, LY96, illetve ANXA1 gének a ROC-analízis során a válaszadókat és nem válaszadókat elkülönítő legjobb gének között szerepeltek (5. ábra). Az 51 génen végzett KEGG-útvonalelemzés eredményei alapján a ferroptózis, az NFκB- és a Notch-jelátvitel felül-

reprezentált. A Reactome adatbázis ugyancsak elsősorban a veleszületett immunválasz génjeinek dúsulását mutatta az 51 gén között.

MEGBESZÉLÉS

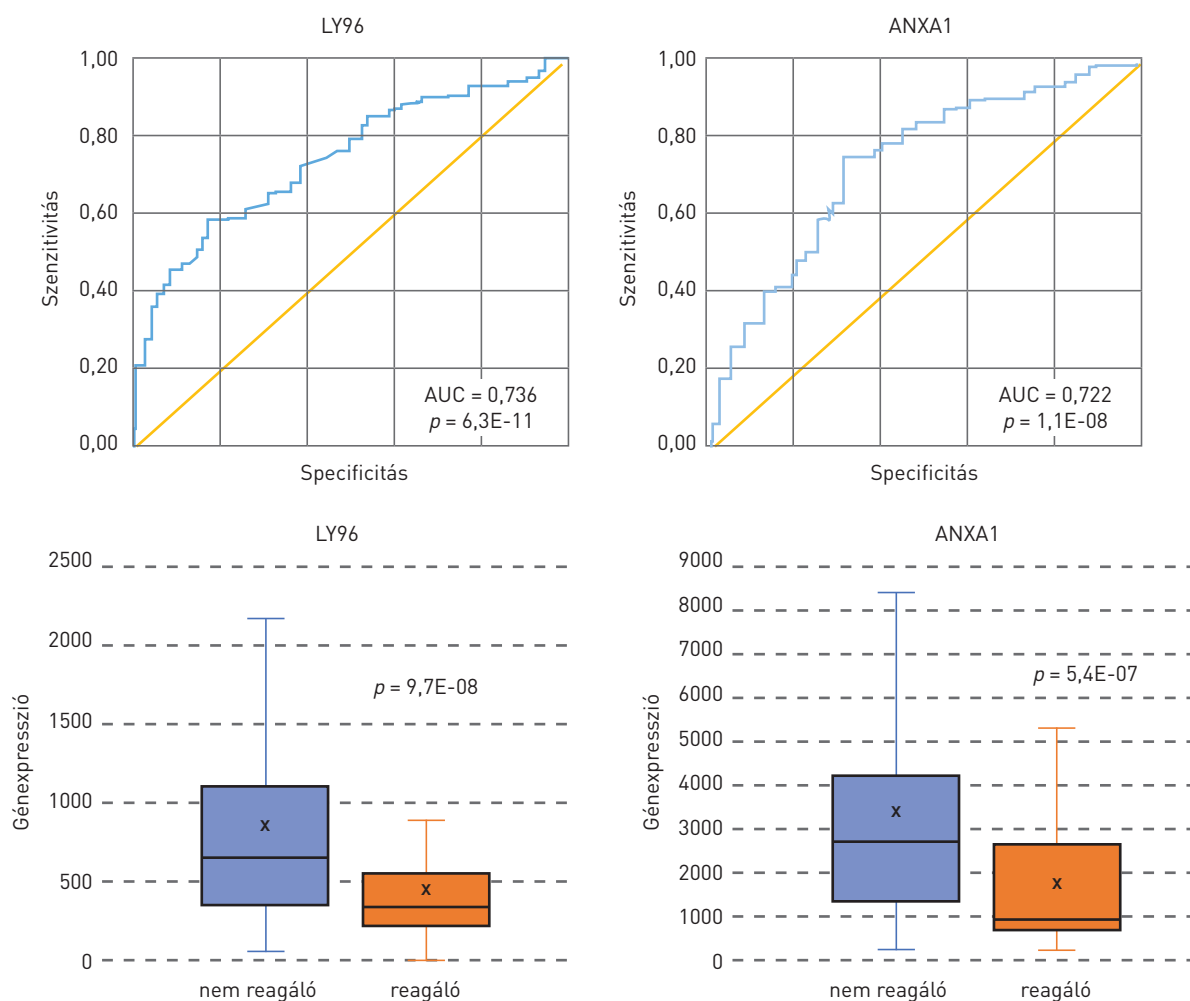
Eredményeink alátámasztják a tumor-mikrokörnyezet összetételének jelentőségét, valamint a tumorszövet metabolikus aktivitásának fontosságát a terápiás válasz kialakulásában. A gyulladásos folyamatok regulációjában és a veleszületett immunválasz kialakításában szerepet játszó gének magas expressziója volt jellemző azon tumorokban, ahol a betegség kiújult a kezeléstől számított 60 hónapon belül. Mivel a betegek nagy része (~90%) neoadjuváns kezelést kapott, a gyulladásos folyamatok, illetve a megváltozott immunkörnyezet a páciensek többségében feltehetőleg a kemoterápiás kezelés következtében alakulhattak ki.

2. TÁBLÁZAT. A terápiára nem reagáló betegekben szignifikánsan felülexpresszált 51 gén a DAVID génontológiai adatbázis alapján elsősorban a gyulladásos folyamatokban és a veleszületett immunválaszban szerepet játszó gének feldúsulását mutatta (false discovery rate = 12,6%)

GO kategória	p-érték	Gének
gyulladásos válasz	4,19E-04	CCR1, AIM2, ANXA1, LY96, CHI3L1, ADM, CD14
veleszületett immunválasz	5,87E-04	LYN, AIM2, ANXA1, MX2, SLA, LY96, DEFB1, CD14
toll-like receptor 4 jelút vonal	6,49E-04	LYN, LY96, CD14

Az emlődagatok szisztémás terápiával szembeni rezisztenciája lényeges probléma, amit az is bizonyít, hogy adatbázisunkban a betegek 64,7%-a esetében történt visszaesés. Azonban meg kell jegyezni, hogy az általunk létrehozott adatszett nem tükrözi az emlőtumor-altípusok előfordulását: a TNBC altípus az összes emlőtumor 10-15%-át teszi ki,

míg a HER2-pozitív emlőkarcinómák aránya 15-20% körül mozog. Ezzel szemben adatbázisunkban a betegek 35%-a tartozott a TNBC altípusba, míg a HER2-pozitív betegek aránya mindössze 4%. Irodalmi adatok alapján a TNBC altípussal diagnosztizált betegek esetében várható a legjobb válasz a szisztémás kemoterápia (pl. antraciklin-taxán) hatására



5. ÁBRA. A génontológiai analízis alapján a gyulladásos folyamatokban és veleszületett immunválaszban szerepet játszó gének (pl. LY96, ANXA1) a relapszusba eső betegek mintáiban magasan expresszáldódtak, és a terápiás választ adó és nem adó betegek elkülönítésének top markerei

[24]. A 187 betegből 121 relabált, ezek közül 44 TNBC besorolása, vagyis adatbázisunkban a TNBC altípusú betegek 33%-a reagált hosszú távon a kezelésre. Ez megközelíti az irodalomban leírt terápiás válasz arányát, mely kezeléstől függően ebben az altípusban a patológiás teljes válasz esetén 30–50% körül mozog [24, 25]. Az elérhető adatok következtében kialakult nem reprezentatív altípuseloszlás tehát leginkább a TNBC és ösztrogénreceptor-pozitív, különösen a luminális B típusú daganatok esetében nyújt betekintést a rezisztencia mechanizmusaiba. A korlátozott mintanagyság miatt sajnos további altípus-specifikus vizsgálatokat végezni nem tudtunk. Mindazonáltal a nem reagáló páciensek mintáiban felszabályozódott markerek nagy része az irodalmi kitekintés alapján az emlődaganatok szélesebb spektrumában is szerepet játszik.

Ismert, hogy a gyulladás az emlőrák fontos prognosztikai markere, mivel a gyulladásos sejtek endotélfaktorokat és egyéb fehérjéket szintetizálnak, amelyek serkentik az érújdonképződést és az extracelluláris mátrix átrendeződését [26]. Egy friss tanulmány továbbá kimutatta, hogy az antraciklinre reagáló és rezisztens páciensek tumor-mikrokörnyezetében jelentősen eltér az immuninfiltrációs mintázat [16]. A gyulladásos folyamatokban és veleszületett immunválasz kialakulásában szerepet játszó LYN, LY96, ANXA1 és CCR1 gének a ROC-elemzésben 0,72 feletti AUC-értékkel szerepeltek, jól elkülönítve a terápiára reagáló, kiújulást nem mutató betegeket. Adatbázisunkban a válaszadókat és nem válaszadókat leginkább elkülönítő LYN az Src-receptorkináz családba tartozik, és jelentősége elsősorban leukémiában vizsgált, ahol állandósult aktivációja BCR-ABL+ leukémia esetén imatinibrezisztenciával társul [27]. Krónikus limfoid leukémia (CLL) esetén a LYN hozzájárul a tumorigenezis szempontjából kedvező mikrokörnyezet kialakulásához a citokinszekréció modulációja és az extracelluláris mátrix összetételének módosítása révén [28]. Újabb eredmények alapján CLL-ben a stróma fibroblasztsejtjeinek befolyásolásával alakítja át a tumor-mikrokörnyezetet [29]. Emlőtumorokban, különösen a TNBC altípusban a LYN fokozott expressziója többször is igazolódott, mely összefüggést mutatott az epiteliális-mezenhimális átalakulással, befolyásolva a sejtek inváziós és metasztatikus képességét [30]. Nem csak TNBC esetén fontos a jelenléte: a LYN-A izoforma magas aránya a LYN-B izoformához képest minden típusú emlőkarcinóma esetén rossz prognózissal társul [29]. Egyelőre emlőkarcinómában a mikrokörnyezetre gyakorolt hatása még nem ismert.

Az LY96, más néven mieloid differenciációs faktor 2 (MD-2) a mikrobákkal szembeni immunvédelem első lépéseihez szükséges glikoprotein. Az MD-2 a toll-like receptor (TLR4) ko-receptora, mely a TLR4 extracelluláris részéhez kötődésén keresztül vesz részt a TLR4 aktiválásában, és elsősorban a Gram-negatív baktériumok külső membránján található bakteriális lipopoliszacharidokra (LPS) adott veleszületett immunválasz elindításában [31]. Az ANXA1 szintén szerepet

játszik a TLR4 regulációjában, és a TLR4 által indukált IFN- β előállításában [32].

Az LPS-TLR4-MD-2 heterodimer komplex a mitogénaktivált proteinkináz- (MAPK) és az NF κ B-út vonal révén elősegíti a gyulladásos citokinek termelődését [33]. Jelenlegi ismereteink szerint nemcsak a baktériumok, hanem a hiperglikémia is képes az MD-2-TLR4 aktiválására, mely például gyulladást indukál a szívizomszövetben [34]. Nem meglepő, hogy az MD-2 (LY96) számtalan gyulladásos és immunfolyamathoz köthető megbetegedésben játszik szerepet, mint például a Crohn-betegség [35], reumatoid artritisz [36] és a diabeteses kardiomiopátia [34]. A kaszkádban szerepet játszó LBP (LPS binding protein) és CD14 gének ugyancsak szerepelnek eredményeink között a nem reagáló betegekben felülregulált gének listájában. Az LBP megragadja a szérumban található LPS-t és átadja a CD14-nek, mely az LPS-t monomerré bontja [33].

A gyulladásos folyamatok elősegítése révén az MD-2 a tumoros megbetegedésekben is fontos szerepet tölthet be: vastagbél- és tüdőkarcinóma-sejtvonalakban az MD-2-inhibitor L6H21 gátolta az NF κ B-út vonal aktiválását, megakadályozta a gyulladásos citokinek termelődését, ezáltal gátolva a sejtvonalak migrációs és inváziós képességét [37]. Magas MD-2-expressziót mértek TNBC emlőkarcinóma-sejtvonalakban (MDA-MB231 és 4T1 sejtekben), ahol az L6H21 gátlószer használata fékezte az *in vitro* proliferációt, migrációt és inváziót, valamint növelte a tumorxenograftot hordozó egerek túlélését [38]. A gyulladásos folyamatok szabályozása mindenképp további figyelmet igényel a kemoterápiával szembeni rezisztencia kivédése szempontjából.

A metabolikus útvonalak felszabályozása a daganatsejtekben intenzíven kutatott terület, és egyre több információ áll rendelkezésre a szisztémás metabolikus változások és a rosszindulatú tumoros megbetegedések közötti kapcsolat megértéséhez. Ismert, hogy a diszlipidémiával, magas vérnyomással és kettes típusú cukorbetegséggel társuló metabolikus szindróma növeli az emlőkarcinóma kialakulásának esélyét [39]. A daganatsejtek azonban nemcsak glükózból fogyasztanak többet, hanem számos tumor aminosavfüggő, mely az mTORC1-út vonal aktiválása révén segíti elő a proteinszintézist és növekedést [40]. Eredményeink között a megváltozott aminosav-anyagcsere fontosságára utal a tumorokban mért magas SLC7A5-expresszió és a betegség kiújulása közötti összefüggés. Az SLC7A5 egy kétirányú, plazmamembránban található aminosav-transzporter, amely biztosítja a tumorsejtek megnövekedett aminosavigényét, különös tekintettel a leucinre, mely az mTORC1 fő aktivátora. Magas expressziója emlőtumoros betegek felében mérhető, és különösen TNBC, HER2+ és luminális B emlőkarcinóma-altípusokra jellemző, mely nagyobb tumormérettel, magasabb grádussal és a távoli metasztázisok gyakoribb jelenlétével korrelál [41]. A magas SLC7A5-expresszió elsősorban ösztrogénreceptor-pozitív (luminális B)

és HER2-pozitív altípusokban társul rossz prognózissal [41], de egyéb (pl. tüdő-, vastagbél-, prosztata- stb.) tumorokban is a rossz kimenetel markere [42]. Magas expressziója és a kemoterápiás kezeléssel szembeni rezisztencia közötti összefüggést emlőtumork [43] és egyéb daganatok, többek között prosztata-, ovárium-, méh- és hasnyálmirigy-tumork esetében is leírták [42]. Tüdőkarcinómákban a magas SLC7A5-expresszió rossz kimenetellel társul, és hozzájárul az immun-suppresszív tumor-mikrokörnyezet kialakulásához, illetve az immunterápiás kezelések hatékonyságának csökkenéséhez [44]. Az SLC7A5 prognosztikus szerepét eredményeink is igazolták, valamint növekvő tendenciát találtunk a normális, a tumoros és metasztatikus szövetből származó génexpressziós értékek között, bár adatbázisunkban nem volt módunk a terápiás válasz tumoraltípus szerinti vizsgálatára. A tumorok széles körében betöltött szerepe miatt az SLC7A5 klinikai vizsgálatokban szereplő gátlószerei, mint például a BCH és JPH203, a gyógyszer-rezisztencia leküzdésében is segítséget nyújthatnak [42].

A metabolizmus és az immunfolyamatok szerepét, egyéb kulcsfontosságú biológiai folyamatok mellett, már korábbi

tanulmányok is kiemelték [45]. Eredményeink tehát kiegészítik a korábbi, főként *in vitro* vizsgálatokból származó gén-expressziós vizsgálatok eredményeit, melyek elsősorban doxorubicin- vagy taxán-monoterápia hatására kialakuló génexpressziós változásokra összpontosítottak sejtkultúrákban [45, 46]. A doxorubicinnal szembeni rezisztencia kialakulásában egérkísérletek alapján az MAPK/ERK útvonal módosult aktivitása is szerepet játszik [47]. Jelen tanulmányunkban a kezelt tumorokból származó génexpressziós mintázatok a daganatsejtek és közvetlen mikrokörnyezetük közötti kölcsönhatásokat jobban tükrözik az *in vitro* vizsgálatokhoz képest, ami magyarázhatja a korábbiaktól eltérő biomarkerek jelenlétét.

Összességében a tumorokban azonosított transzkriptomikai perturbációk megerősítik az antraciklin-paklitaxel kezeléssel szembeni rezisztencia korábban már leírt biomarkereit, és felhívják a figyelmet a megváltozott metabolizmus és immunkörnyezet fontosságára. Eredményeink elősegíthetik a betegek osztályozását és a kezelés szempontjából releváns célpontok azonosítását, valamint további biomarker-validációs vizsgálatok kiindulópontjául szolgálhatnak.

IRODALOM

1. Arnold M, Morgan E, Rumgay H, et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast* 66:15–23, 2022
2. Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, et al. Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol* 8:420–444, 2022
3. Mesa-Eguiaagaray I, Wild SH, Rosenberg PS, et al. Distinct temporal trends in breast cancer incidence from 1997 to 2016 by molecular subtypes: a population-based study of Scottish cancer registry data. *Br J Cancer* 123:852–859, 2020
4. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, et al. Breast cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 72:524–541, 2022
5. Peto R, Davies C, Godwin J, et al. Comparisons between different polychemo-therapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 379:432–444, 2012
6. Anthracycline-containing and taxane-containing chemotherapy for early-stage operable breast cancer: a patient-level meta-analysis of 100 000 women from 86 randomised trials. *Lancet* 401:1277–1292, 2023
7. Beretta GL, Zunino F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Top Curr Chem* 283:1–19, 2008
8. Abal M, Andreu JM, Barasoain I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* 3:193–203, 2003
9. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 608:1–22, 2007
10. Burger H, Foekens JA, Look MP, et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 9:827–836, 2003
11. Mechetner E, Kyshtobayeva A, Zonis S, et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res* 4:389–398, 1998
12. Pasquier J, Magal P, Boulangé-Lecomte C, et al. Consequences of cell-to-cell P-glycoprotein transfer on acquired multidrug resistance in breast cancer: a cell population dynamics model. *Biol Direct* 6:5, 2011
13. Harbottle A, Daly AK, Atherton K, et al. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int J Cancer* 92:777–783, 2001
14. Guo B, Tam A, Santi SA, et al. Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells. *BMC Cancer* 16:762, 2016
15. Aas T, Børresen AL, Geisler S, et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2:811–814, 1996
16. Liu Z, Gao J, Gu R, et al. Comprehensive analysis of transcriptomics and genetic alterations identifies potential mechanisms underlying anthracycline therapy resistance in breast cancer. *Biomolecules* 12:1834, 2022
17. Knappskog S, Leirvaag B, Gansmo LB, et al. Prevalence of the CHEK2 R95* germline mutation. *Hered Cancer Clin Pract* 14:19, 2016
18. Gautier L, Møller M, Friis-Hansen L, et al. Alternative mapping of probes to genes for Affymetrix chips. *BMC Bioinformatics* 5:111, 2004
19. Li Q, Birkbak NJ, Györfy B, et al. Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene. *BMC Bioinformatics* 12:474, 2011
20. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 12:115–121, 2015
21. Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists [2021 update]. *Nucleic Acids Res* 50:W216–w221, 2022
22. Lánckzy A, Györfy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): development and implementation. *J Med Internet Res* 23:e27633, 2021
23. Bartha Á, Györfy B. TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues. *Int J Mol Sci* 22:2622, 2021
24. van den Ende NS, Nguyen AH, Jager A, et al. Triple-negative breast cancer and predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy: a systematic review. *Int J Mol Sci* 24:2969, 2023
25. Li Y, Zhang H, Merkher Y, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* 15:121, 2022
26. Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol* 27:3437–3444, 2009
27. Wu J, Meng F, Kong LY, et al. Association between imatinib-resistant BCR-ABL mutation-negative leukemia and persistent activation of LYN kinase. *J Natl Cancer Inst* 100:926–939, 2008

28. Nguyen PH, Fedorchenko O, Rosen N, et al. LYN kinase in the tumor microenvironment is essential for the progression of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 30:610–622, 2016
29. Vom Stein AF, Rebollido-Rios R, Lukas A, et al. LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1. *Nat Commun* 14:1330, 2023
30. Choi YL, Bocanegra M, Kwon MJ, et al. LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res* 70:2296–2306, 2010
31. Dou T, Fu M, Wang Y, et al. Signatures of positive selection in LY96 gene in vertebrates. *J Biosci* 38:899–904, 2013
32. Bist P, Shu S, Lee H, et al. Annexin-A1 regulates TLR-mediated IFN- β production through an interaction with TANK-binding kinase 1. *J Immunol* 191:4375–4382, 2013
33. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 45:e66, 2013
34. Wang Y, Luo W, Han J, et al. MD2 activation by direct AGE interaction drives inflammatory diabetic cardiomyopathy. *Nat Commun* 11:2148, 2020
35. Yang Y, Sheng Y, Wang J, et al. Aureusidin derivative CNQX inhibits chronic colitis inflammation and mucosal barrier damage by targeting myeloid differentiation 2 protein. *J Cell Mol Med* 25:7257–7269, 2021
36. Rychkov D, Neely J, Oskotsky T, et al. Cross-tissue transcriptomic analysis leveraging machine learning approaches identifies new biomarkers for rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 12:638066, 2021
37. Rajamanickam V, Yan T, Xu S, et al. Selective targeting of the TLR4 co-receptor, MD2, prevents colon cancer growth and lung metastasis. *Int J Biol Sci* 16:1288–1302, 2020
38. Zheng S, Fu W, Ma R, et al. Suppression of MD2 inhibits breast cancer in vitro and in vivo. *Clin Transl Oncol* 23:1811–1817, 2021
39. Dibaba DT, Ogunsina K, Braithwaite D, et al. Metabolic syndrome and risk of breast cancer mortality by menopause, obesity, and subtype. *Breast Cancer Res Treat* 174:209–218, 2019
40. Bond P. Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and mechanical stimuli at a glance. *J Int Soc Sports Nutr* 13:8, 2016
41. El Ansari R, Craze ML, Miligy I, et al. The amino acid transporter SLC7A5 confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes and is a key therapeutic target in luminal B tumours. *Breast Cancer Res* 20:21, 2018
42. Saito Y, Soga T. Amino acid transporters as emerging therapeutic targets in cancer. *Cancer Sci* 112:2958–2965, 2021
43. Sato M, Harada-Shoji N, Toyohara T, et al. L-type amino acid transporter 1 is associated with chemoresistance in breast cancer via the promotion of amino acid metabolism. *Sci Rep* 11:589, 2021
44. Liu Y, Ma G, Liu J, et al. SLC7A5 is a lung adenocarcinoma-specific prognostic biomarker and participates in forming immunosuppressive tumor microenvironment. *Heliyon* 8:e10866, 2022
45. Ciocan-Cartita CA, Jurj A, Zanoaga O, et al. New insights in gene expression alteration as effect of doxorubicin drug resistance in triple negative breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 39:241, 2020
46. Chou CW, Huang YM, Chang YJ, et al. Identified the novel resistant biomarkers for taxane-based therapy for triple-negative breast cancer. *Int J Med Sci* 18:2521–2531, 2021
47. Christowitz C, Davis T, Isaacs A, et al. Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. *BMC Cancer* 19:757, 2019