

# A molekuláris altípusok szerinti heterogenitás biológiai és klinikai jelentősége kissejtes tüdőrákban

BERTA JUDIT<sup>1</sup>, FERENCZ BENCE<sup>1,2</sup>, HORVÁTH LILLA<sup>1</sup>, FILLINGER JÁNOS<sup>1</sup>, LANTOS ANDRÁS<sup>1</sup>, BOGOS KRISZTINA<sup>1</sup>, RÉNYI-VÁMOS FERENC<sup>1,2</sup>, MEGYESFALVI ZSOLT<sup>1,2,3\*</sup>, DÖME BALÁZS<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, <sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Országos Onkológiai Intézet bázisán működő Mellkassebészeti Klinika, Budapest, <sup>3</sup>Bécsi Orvostudományi Egyetem, Mellkassebészeti Tanszék, Bécs, Ausztria, <sup>4</sup>Lundi Egyetem, Transzlációs Medicina Tanszék, Lund, Svédország  
\*Megosztott utolsó szerzők

A közleményhez kapcsolódó munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal KH130356, KKP126790, 2020-1.1.1.6-JÖVŐ, TKP2021-EGA-33 kódszámú, a Magyar Tudományos Akadémia PC2022-II-19/1/2022 támogatói okiratszámú, valamint a Horizon Europe Framework Programme MSCA Staff Exchanges 2022 pályázatai támogatták. MZs az Új Nemzeti Kiválósági Program (ÚNKP-20-3 és ÚNKP-21-3) és a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának kedvezményezettje, valamint a Nemzetközi Tüdőrák Szövetség (IASLC) Fialat Kutatója 2022 díj nyertese. FB a Semmelweis 250+ Kiválósági PhD Ösztöndíj (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009) támogatottja.

## Levelezési cím:

Dr. Berta Judit, Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, 1121 Budapest, Korányi Frigyes út 1., e-mail: berta.judit@koranyi.hu, tel.: 36-1-391-3310

## Közlésre érkezett:

2023. július 5.

## Elfogadva:

2023. augusztus 25.

A kissejtes tüdőrák (SCLC) rendkívül agresszív és gyakran halálos kimenetelű rosszindulatú daganatos betegség, amelyre a genomikai instabilitás és a korai áttétképzés jellemző. A betegeket jellemzően előrehaladott stádiumban diagnosztizálják, amikor az immunterápiával kiegészített platinaalapú kemoterápia jelenti a terápiás megközelítést. A szisztémás kezeléssel egyidejűleg alkalmazott sugárterápia szerepe szintén megalapozott az SCLC-ben szenvedő betegek esetében. Bár ezek a terápiák kezdetben valóban hatékonyak, a legtöbb betegnél gyorsan kialakuló rezisztencia mutatkozik. Mindez egyértelműen szükségessé teszi a jelenlegi terápiás stratégiák hatékonyságának növelését és alkalmazási körük bővítését. E korábban homogénnek tekintett megbetegedés feltérképezésében a közelmúltban elért eredmények az SCLC osztályozási sémájának új modelljéhez vezettek bizonyos kulcsfontosságú transzkripciós szabályozók expressziója és gyulladásos jellegzetességek alapján. Az SCLC molekuláris altípusairól szerzett új biológiai ismeretek az altípus-specifikus terápiás megközelítések megvalósítását eredményezhetik. Jelen közleményünkben összefoglaljuk legfontosabb megállapításainkat a molekuláris altípusok biológiai és klinikai relevanciájáról. *Magy Onkol* 67:181–192, 2023

**Kulcsszavak:** kissejtes tüdőrák, heterogenitás, molekuláris altípusok, proteomika

*Small-cell lung cancer (SCLC) is a highly aggressive malignancy characterised by genomic instability and early metastatic spread. Patients are typically diagnosed at advanced disease stage, when platinum-based chemotherapy with immunotherapy represents the standard therapeutic approach. The role of radiotherapy with concomitant systemic therapy is also well established in the management of SCLC patients. Although these therapeutic approaches are initially effective, most patients rapidly develop resistance. This clearly highlights the need to improve therapeutic efficacy and broaden the scope of current therapeutic strategies. Recent advances in the study of this disease, once considered homogeneous, have led to a new model of the SCLC classification scheme based on the relative expression of certain transcriptional regulators and inflammatory characteristics. New biological insights into the molecular subtypes of SCLC could lead to the implementation of subtype-specific therapeutic approaches. Here, we summarise our key findings concerning the biological and clinical relevance of SCLC molecular subtypes.*

*Berta J, Ferencz B, Horváth L, Fillinger J, Lantos A, Bogos K, Rényi-Vámos F, Megyesfalvi Z, Döme B. Small cell lung cancer heterogeneity and molecular subtypes: biological and clinical relevance. *Magy Onkol* 67:181–192, 2023*

**Keywords:** small cell lung cancer, heterogeneity, molecular subtypes, proteomics



## BEVEZETÉS

A kissejtes tüdőrák („small cell lung cancer”, SCLC) a tüdőrákos esetek mintegy 13–15%-át teszi ki, és – a kevesebb mint 7%-os ötéves túlélési arányával – a rosszindulatú megbetegedések egyik leghalálosabb formájának számít (1–3). Az SCLC-t rendkívül agresszív kórlefolyás, kiterjedt kromoszómaátrendeződések, nagy mutációs teher és a tumorprotein P53 (TP53), valamint a retinoblasztóma 1 (RB1) tumorszuppresszor gének csaknem általános inaktivációja jellemzi (1, 4). Agresszív mivolta miatt a betegek kétharmadánál már a kezdeti diagnózis felállításakor mellkason kívüli szervei áttétek figyelhetők meg (4). Ennek megfelelően a betegeket általában szisztémás citotoxikus kemoterápiával és immunterápiával kezelik, egyidejű sugárkezeléssel vagy anélkül (1, 5, 6). Bár az SCLC kezdetben kivételesen jól reagál a platinaalapú terápiákra és a terápiás válasz aránya következetesen meghaladja a 60%-ot, az esetek többségében gyorsan rezisztencia alakul ki, és a betegség kiújul (4, 7). Fontos megjegyezni, hogy a célzott terápiák az SCLC-ben szenvedő betegeknél eddig kudarcot vallottak, és az immunterápia nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC) tapasztalt hatékonysága nem tükröződik SCLC esetében (3, 8).

Bár az SCLC-t korábban homogén, egyetlen morfológiai típussal rendelkező betegségnek tekintették, a humán tumorokon és preklinikai modelleken (SCLC-sejtvonalakon, genetikailag módosított egérmodelleken és betegből származó xenograftokon) végzett legújabb kutatások azt mutatják, hogy az SCLC-tumorok az achaete-scute homologue 1 (ASCL1), a neurogenic differentiation factor 1 (NEUROD1) és a POU class 2 homeobox 3 (POU2F3) transzkripciós faktorok emelkedett expressziója, illetve bizonyos gyulladáshoz jellemzők alapján különböző altípusokba sorolhatók (6, 9).

Az ASCL1-et nagymértékben expresszáló tumorok (SCLC-A altípus) a neuroendokrin (NE) markerek magasabb expressziójával jellemezhetők, míg a magas NEUROD1-expressziójú daganatok (SCLC-N altípus) általában alacsonyabb NE marker expressziót mutatnak, ezért kevésbé NE jellegű fenotípus társul hozzájuk (9–14). Ami a nem NE altípusokat illeti, a magas POU2F3-expressziójú tumorok (SCLC-P altípus) eltérő expressziós profilja és transzkripciós faktor meghatározottsága arra utal, hogy ez az altípus – az előzőekben részletezett altípusokhoz képest – eltérő sejtes eredettel rendelkezik, és az SCLC egy jellegzetes kefesejtes variánsát képviselheti (9, 15). Kezdetben egy negyedik molekuláris altípust is feltételeztek, amelyet a yes-associated protein 1 (YAP1) transzkripciós faktor vezérel (9), azonban több független vizsgálat sem erősítette meg egy különálló SCLC-Y altípus létezését (6, 10, 16, 17). Ehelyett egy – RNS-szekvenálási adatokon és annak immunhisztokémiai (IHC) validálásán alapuló – nemrégiben végzett vizsgálat egy gyulladáshoz („inflamed”) SCLC-altípus (SCLC-I) létezésére szolgáltatott bizonyítékot (18). Az emelkedett ASCL1-, NEUROD1- és POU2F3-expresszió hiánya mellett az SCLC-I gyulladással asszociált genetikai mintázatot és mezenhimális jellemzőket mutat (6, 18). Ami a nomenklatúrát illeti, az SCLC-I alternatívája lehet az

újonnan javasolt négyszeresen negatív („quadruple negative”) altípusnak (SCLC-QN), amelyet mind a négy transzkripciós szabályozó (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1) alacsony expressziója jellemez (6, 17). Bár sem az SCLC-I-t, sem az SCLC-QN-t nem a YAP1 expressziója határozza meg, jelenleg még vitatott, hogy ezek azonos altípusnak tekinthetők-e, vagy két különböző alcsoportot alkotnak a nem NE SCLC-k skáláján belül (6).

Ezen összefoglaló munkánkban munkacsoportunk legújabb eredményeit összegezzük e molekuláris altípusok biológiai és klinikai relevanciájának vonatkozásában, a személyre szabott és altípus-specifikus terápiás megközelítések kidolgozásának elősegítése érdekében.

## A MOLEKULÁRIS ALTÍPUSOK MEGOSZLÁSÁNAK ÉS KLINIKOPATOLÓGIAI JELENTŐSÉGÉNEK ELEMZÉSE SEBÉSZILEG RESZEKÁLT SCLC-MINTÁK FELHASZNÁLÁSÁVAL

Az SCLC-szövetminták korlátozott hozzáférhetősége és a megfelelő klinikai adatok hiánya miatt további kutatások szükségesek az altípusokat meghatározó fehérjeexpressziós mintázatok tisztázásához. Így csoportunk a közelmúltban nagyszámú, sebészileg reszekált SCLC-mintában határozta meg a kulcsfontosságú transzkripciós szabályozók, valamint az RB1 és P53 fehérjék expresszióját és klinikopatológiai jelentőségét (17). Két kohorszt különítettünk el a vizsgálati populációban: a teljes szövetminta kohorszban („whole tissue section”, WTS) a teljes sebészeti minták formalinban rögzített, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkok formájában voltak elérhetők, míg a TMA-kohorszban szöveti microarray-eket („tissue microarray”, TMA) használtunk fel (17). Vizsgálatunk során az SCLC-A (ASCL1-domináns), SCLC-AN (kombinált ASCL1/NEUROD1), SCLC-N (NEUROD1-domináns), és SCLC-P (POU2F3-domináns) altípusok mellett egy négyszeresen negatív (ún. SCLC-QN) altípust is meghatároztunk, amely a négy vizsgált transzkripciós faktor alacsony expressziójával jellemezhető (17). Fontos megjegyezni, hogy az SCLC-QN-t nem a YAP1 expressziója határozza meg, így ez elkülöníti osztályozásunkat a Rudin és munkatársai által javasolt osztályozástól (9). Mindazonáltal eredményeink felhívják a figyelmet a nemrégiben javasolt SCLC-I altípusra is, amelyet szintén az összes altípus-specifikus marker alacsony expressziója határoz meg (18). Kiemelendő, hogy az SCLC-I mezenhimális jellegzetességeket és gyulladáshoz fenotípust mutat, amelyek más tumorokban előre jelzik az immunellenőrzőpont-gátlásra adott terápiás választ (18–20). Ugyanakkor nem találtunk elkülönülő SCLC-Y altípust, amely összhangban van Baine és munkatársai eredményeivel (10). A tumorális diverzitás tekintetében vizsgálatunkban két formáját észleltük az intratumorális heterogenitásnak. Néhány tumorban ugyanazon területeken belül voltak olyan sejtek, amelyek expresszálták és nem expresszálták az altípus-specifikus markereket, míg más mintákban ezek a sejtklaszterek térben elkülönülő régiókban mutatkoztak

(17). Ez utóbbi jelenség megerősíti Gay és munkatársai eredményeit (18), és alátámasztja azt a feltételezést, hogy a kis biopsziás minták nem minden esetben tükrözik a teljes tumor expressziós profilját. Fontos megemlíteni továbbá, hogy az SCLC magas plaszticitása miatt a műtéttel eltávolítható tumorok nem feltétlenül reprezentálják teljes mértékben az SCLC teljes spektrumát a klinikai és a patológiai jellemzők tekintetében (9). Ezért eredményeink elsősorban a sebészileg kezelhető SCLC esetében lehetnek iránymutatók a molekuláris altípusok prognosztikai jelentőségére és eloszlási mintázatára vonatkozóan. Mindazonáltal eredményeink alapul szolgálhatnak a későbbi megerősítő vizsgálatoknak és az előrehaladott stádiumú betegekben végzett tanulmányoknak.

Az altípus-specifikus fehérjék és a P53, illetve RB1 fehérjék korrelációs mintázata alapján a YAP1 és az RB1 expressziója között pozitív lineáris korrelációt találtunk (17). Ez összhangban van egy nemrégiben végzett preklinikai vizsgálattal, amely szerint a YAP1-et expresszáló SCLC-sejtvonalak intakt RB1-gyel társulhatnak (21). Ugyanakkor, figyelembe véve mind a YAP1, mind az RB1 alacsony expresszióját, óvatosan kell értelmezni az ezekre a fehérjékre vonatkozó eredményeket.

Az altípusokat meghatározó fehérjék klinikopatológiai és prognosztikai jelentősége továbbra sem tisztázott kellő mértékben a megfelelő klinikai adatokkal rendelkező sebészeti esetek alacsony száma és a szövetszövetminták morfológiai heterogenitása miatt (pl. kombinált SCLC/NSCLC vagy SCLC/nagysejtes neuroendokrin karcinóma). Az általunk végzett vizsgálat tudomásunk szerint az első a szakirodalomban, amely részletesen beszámol a molekuláris altípusok jelentőségéről a sebészileg kezelt SCLC-s betegek prognózisára vonatkozóan (17). Tanulmányunkban a legjobb túlélési mutatók a nem neuroendokrin (SCLC-P és SCLC-QN) altípusokhoz társultak, míg a legkedvezőtlenebb prognózis NE (SCLC-A, SCLC-N, SCLC-AN) altípusok esetén volt észlelhető (17). Ezzel összhangban, univariációs modellben azt találtuk, hogy az ASCL1 vagy a POU2F3 egyéni (altípustól független) expressziója rosszabb (ASCL1), illetve jobb túléléssel (POU2F3) párosul (17). Az erőteljes neuroendokrin jellemzőket általában a tüdőrákos betegek rossz prognózisának jeleként írják le (22, 23). Egy nemrégiben végzett IHC-alapú elemzés is arra utal, hogy az ASCL1-pozitív tumorral rendelkező betegek túlélési eredményei általában rosszabbak, mint az ASCL1-negatív SCLC-ben szenvedők (24). Hasonlóképpen, az ASCL1-expresszió a kedvezőtlen prognózis jele lehet az NE differenciálódású tüdő-adenokarcinómákban (25). Érdeemes megemlíteni, hogy vizsgálatunkban a magas ASCL1-expresszió a késői stádiumú SCLC-vel volt összefüggésbe hozható (17). Fontos azonban kiemelni, hogy a többváltozós túlélési elemzés azt mutatta, hogy az ASCL1-expresszió a betegség stádiumától és más klinikai tényezőktől függetlenül befolyásolja a túlélési eredményeket (17).

Az SCLC-ben szenvedő betegeknél az NE jellemzők és a túlélés közötti mechanisztikus kapcsolat még nem egyér-

telmű. Azonban csoportunk egy korábbi vizsgálata során az alacsony NE tulajdonságokkal bíró SCLC-khez fokozott immunsejt-infiltráció (CD45+, CD3+ és CD8+ sejtek) társult, szemben a magas NE jellemzőket mutató tumorokkal (26). Ez összhangban van Gazdar és munkatársai megállapításával (27) amely szerint az „NE-alacsony” tumorok fokozott immunogenitással és „forró” vagy „immunoázis” fenotípussal rendelkeznek, míg az „NE-magas” tumorok „immunsivatag” fenotípussal jellemezhetők.

Egy másik lehetséges magyarázat a kedvezőtlen túlélésre az NE-magas SCLC-ben az lehet, hogy e tumorok túlzott hormontermeléssel társulhatnak, és így gyakrabban alakulnak ki paraneoplasztikus szindrómák (28, 29). E paraneoplasztikus tünetegyüttesek negatívan befolyásolhatják mind a korai, mind a késői stádiumú SCLC-ben szenvedő betegek túlélését (30).

A magas POU2F3-expresszióval rendelkező tumorokra nem a klasszikus NE markerek jellemzőek, hanem a kefe-sejtvonal markerei (15). Így az SCLC-P betegek prognózisa valószínűsíthetően jobb, mint az NE vonásokat mutató SCLC-ben szenvedők. Ezt alátámasztja az is, hogy az IHC-vel igazolt POU2F3-expresszió magasabb medián túléléssel párosult univariációs elemzéseink során (17). A POU2F3 prognosztikai jelentőségére vonatkozó adataink részben összhangban vannak Huang és munkatársai eredményeivel is (15). Tanulmányukban e szerzők egy korábban publikált adathalmaz RNS-seq-adatait értékelték újra (13), és azt találták, hogy a „POU2F3-magas” tumorral rendelkező betegekben a túlélési arányok nem szignifikánsan magasabbak, mint a „POU2F3-alacsony” tumorokban (15). Érdeemes megemlíteni, hogy bár nem találtunk szignifikáns összefüggést a betegség stádiuma és a POU2F3 expressziója között, a „POU2F3-magas” alcsoportba tartozó betegeknél inkább a korai stádiumú tumorok voltak jellemzőek (17). Ez is hozzájárulhat az ilyen betegeknél megfigyelt jobb túlélési eredményekhez.

### SCLC-SEJTVONALAK PROTEOMIKAI ÉS SEJTVIABILITÁSI VIZSGÁLATAI

Humán SCLC-sejtvonalak részletes proteomikai elemzése során több mint 8000 fehérjét azonosítottunk és kvantifikáltunk (17). IHC-eredményeinkkel ellentétben, a sejtvonalaknak az ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1 fehérjék expressziója alapján végzett, felügyelet nélküli klaszterezésekor megkülönböztettünk egy önálló YAP1, egy kevert SCLC-AN és egy heterogén SCLC-P klasztert (17). Fontos megjegyezni, hogy a YAP1-expresszió különbségeit már korábban leírták az SCLC-sejtvonalak és a szövetszövetminták között (10, 18), azonban ez további vizsgálatokat igényel. A YAP1 elvesztésével kapcsolatos lehetséges magyarázatok a tumor mikro környezetével, az RB1-mutációs státusszal és a kemoterápiás érzékenységgel kapcsolatosak (21, 31). Újabb preklinikai modellek azt sugallják, hogy a YAP1 expressziója kulcsfontosságú lehet a vad típusú RB1 gént

hordozó, kemoterápiára rezisztens esetekben [21, 31]. Az altípus-specifikus fehérjék és az RB1/P53 expressziójának korrelációs mintázatát vizsgálva, statisztikailag szignifikáns negatív lineáris korrelációt találtunk a YAP1 és a POU2F3 expressziója között, de nem találtunk korrelációt az RB1 és a P53 expressziója között [17].

Az altípus-specifikus fehérjeexpressziók terápiás jelentőségének vizsgálata céljából korreláltattuk a fehérjék koncentrációját a különböző célzott és kemoterápiás szerek 50%-os gátló hatást okozó koncentrációjának (IC50) értékeivel. Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az ASCL1 abundanciája és az auróra-kinázt (AURK) gátló aliszertib IC50-értékei között, valamint a YAP1 abundanciája és a ciklindependens kinázt (CDK) gátló abemaciklib

és CGP60474 IC50-értékei között [17]. Ezenkívül megfigyeltük, hogy a magas NEUROD1-fehérje-abundancia *in vitro* érzékenységet jelent az aliszertib, a baraszertib, az abemaciklib, a CGP60474 és az inzulinszerű növekedési faktor-1 receptort (IGF-1R) gátló BMS-754807 szerekkel szemben [17]. A hagyományos kemoterápiás szerekkel kapcsolatban statisztikailag szignifikáns negatív lineáris korrelációt találtunk a POU2F3-abundancia és a ciszplatin, irinotekán, topotekán és etopozid IC50-értékei között. Emellett statisztikailag szignifikáns pozitív lineáris korrelációt találtunk a YAP1 koncentrációja és a ciszplatin, irinotekán és topotekán IC50-értékei között [17]. Az 1. táblázat összegzi az altípusok szerint csoportosított sejtvonalak ciszplatin, etopozid és topotekán kemoterápiás szerekre

1. TÁBLÁZAT. Humán SCLC-sejtvonalak kemoterápiás szerekre mutatott érzékenysége altípusok szerint

Altípus	Sejtvonal	Kemoterápiás szer		
		ciszplatin	etopozid	topotekán
SCLC-A	DMS153 Wien	S	S	S
	DMS153 Denver	M	M	M
	H146	M	S	M
	DMS53	M	S	S
	H1688	R	M	R
	H1882	S	M	S
	SHP77	M	R	R
	H187	S	S	M
SCLC-N	H82	S	M	R
	H446	M	M	M
	GLC4	R	M	M
	H524	S	R	M
	H2171	R	R	S
	H1694	S	S	S
	N417	R	R	M
SCLC-P	H211	M	M	S
	H526	S	S	S
	H1048	M	S	M
	COR	S	S	S
SCLC-Y	H196	M	R	R
	H841	R	S	R
	CRL2066	M	R	R
	HLHE	R	R	R
	H372	R	R	R
	H1341	R	M	R
	CRL2177	R	R	S

A sejtvonalakat molekuláris altípusok szerint csoportosítottuk. A kemoterápiás szerekre mutatott érzékenységet az IC50-értékek alapján állapítottuk meg. Így ciszplatin esetében, ha az IC50  $\leq 2,23$ , érzékeny, ha  $2,23-10,97$ , kevésbé érzékeny, ha  $>10,97$ , rezisztens a sejtvonal. Etopozid esetében, ha az IC50  $\leq 2$ , érzékeny, ha  $2-7,75$ , kevésbé érzékeny, ha  $>7,75$ , rezisztens. Topotekán esetében, ha az IC50  $\leq 0,215$ , érzékeny, ha  $0,215-0,725$ , kevésbé érzékeny, ha  $>0,725$ , rezisztens (S: érzékeny, M: kevésbé érzékeny, R: rezisztens)

mutatott érzékenységet. A táblázat alapján is egyértelműen kirajzolódik, hogy az SCLC-Y altípusba tartozó sejtvonalak a legkevésbé érzékenyek a vizsgált kemoterápiás szerekkel szemben.

A NEUROD1-et magasan expresszáló sejtek AURK- és CDK-gátlókkal szembeni érzékenységet illetően az eredményeink összhangban vannak a korábbi vizsgálatokkal [3, 9, 14]. Érdeemes megjegyezni, hogy ezek a MYC által vezérelt NEUROD1-et nagymértékben expresszáló sejtek fokozott AURK-aktivitással rendelkeznek, amely előre jelezheti az auróra-kináz A (AURKA-) és AURKB-gátlók hatékonyságát [9, 14]. Emellett a MYC-amplifikált SCLC-k várhatóan érzékenyek lesznek a CDK-gátlókra is a MYC szintetikus letális célpontjainak gátlásával [32].

Még keveset tudunk a kemoterápiás szerek molekuláris altípusok szerinti terápiás hatékonyságáról. Az eredményeink összhangban vannak Ito és munkatársai eredményeivel, akik azt találták, hogy a YAP1 elvesztése a kemoterápiára adott válasz ígéretes előrejelzője lehet SCLC-ben [31]. A YAP1 kifejezett jelenléte és a kemoterápiára adott rezisztencia közötti erős korreláció alapján a YAP1-pozitív sejtek túlsúlya valószínűleg jellemzőbb a már kemoterápiával kezelt betegekénél, magyarázatot adva a YAP1-domináns altípus hiányára a műtétilen kezelt kohorszunkban. Végül, a magas POU2F3-expresszáló sejtek ciszplatinnal, irinotekánnal, topotekánnal és etopoziddal szemben mutatott nagyobb érzékenysége részben magyarázhatja a „POU2F3-magas” molekuláris altípusban tapasztalt jobb túlélési eredményeket. Érdeemes megjegyezni, hogy Gay és munkatársai is hasonló tendenciát találtak az SCLC-P sejtvonalakban a ciszplatinnal szemben javult terápiás válasznak köszönhetően [18].

### SCLC-SEJTVONALAK EGYEDI ALTÍPUS-SPECIFIKUS PROTEOMIKAI PROFILJA

Egy másik, nemrégiben publikált tanulmányunkban humán SCLC-sejtvonalakat vetettünk alá proteomikai vizsgálatnak tömeges fehérjemeghatározás és kvantifikálás céljából, amelyet bioinformatikai elemzések követtek [33]. A proteomikai adatokat korreláltattuk a sejtvonalak fenotípusos jellemzőivel, valamint az SCLC-sejtvonalak és szövetek nyilvánosan elérhető transzkriptomikai adataival [33]. Az SCLC-altípusok egyedi vonásainak leírása érdekében megvizsgáltuk az altípusok között különbözőképpen expresszálódó fehérjéket, és multiomikai útvonal szintű elemzést végeztünk. Ennek megfelelően feltártuk a lehetséges altípus-specifikus terápiás lehetőségeket [33].

Átfogó sejtproteomikai profiljaik alapján az SCLC-sejtvonalainkat négy alcsoportba tudtuk besorolni (SCLC-A, SCLC-N, SCLC-P és SCLC-Y), amelyek megegyeztek az előre meghatározott mRNS-alapú altípusokkal [33].

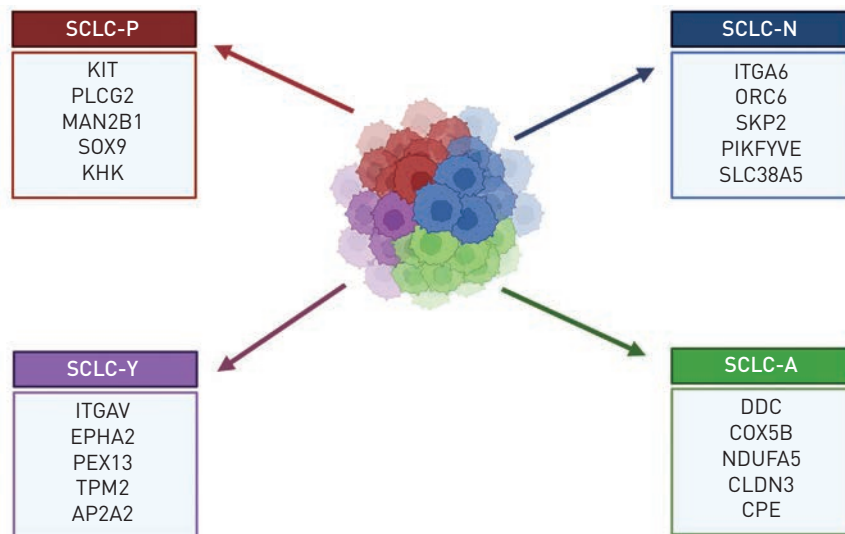
Általánosságban a Myc proto-onkogén (MYC) család számos tagját azonosítottuk, amelyek általánosan kifejeződtek a mintáinkban, mint például a MYC és az L-Myc (MYCL) [9], vagy a transzkripciót aktiváló nukleáris faktor 1 B-típus

(NFIB) [34]. A TP53 és RB1 gének fehérjetermékeit, amelyekről jól ismert, hogy genetikailag megváltoznak SCLC-ben [35–37], a sejtvonalak mindegyikében (TP53), illetve túlnyomó többségében (RB1) kvantifikáltuk, függetlenül a sejtvonalak korábban leírt TP53- és RB1-mutációs státuszától [38]. Számos jól elfogadott altípusmarker [3] a várt fehérjexpressziós profilt mutatta az altípusok között, mint például a kromogranin-A (SCLC-A-marker), az antraxtoxin-receptor 1 (SCLC-N-marker), az advillin (SCLC-P-marker) és integrinek (SCLC-Y-marker) [33].

A sejtvonalakat tovább jellemeztük az NE és az epiteliális-mezenhimális tranzíció (EMT) jellemzőik alapján. A várakozásoknak megfelelően a legtöbb SCLC-A sejtvonal erősebben expresszálta az NE- és epiteliális markereket, mint a nem NE és a mezenhimális markereket [33]. Az SCLC-N inkább NE altípusnak bizonyult, vegyes epiteliális-mezenhimális jellemzőkkel [33]. Az SCLC-P mérsékelt nem NE jellemzőket mutatott (azaz alacsonyabbat, mint az SCLC-A és -N, de magasabbat, mint az SCLC-Y); azonban ebben az altípusban az epiteliális markerek magas expresszióját tapasztaltuk [33]. Ezzel szemben az SCLC-Y sejtvonalak kiemelkedő nem NE és mezenhimális vonásokat mutattak. Ezen eredményekkel összhangban, a delta-szerű protein 3 (DLL3) fehérje, amely egy gátló Notch-útvonal-ligandum [39], az SCLC-A-tól az SCLC-Y felé csökkenő mennyiségben fejeződött ki, a Notch-útvonal fokozatos aktiválódására utalva [33].

Az 1. ábrán öt-öt, altípus-specifikus proteint meghatározó gént tüntettünk fel molekuláris altípusonként, amelyek túlszabályozottak az adott altípusban. Ezek és a részletes proteomikai elemzéssel meghatározott többi túl- vagy alulszabályozott protein az egyes alcsoportokban különböző biológiai folyamatokban vesznek részt. Az ASCL1 neurális differenciálódásban betöltött, jól ismert szabályozó szerepének köszönhetően [40] a neurális prekursorsejt proliferációjával és a szubpallium fejlődésével kapcsolatos fehérjék mutattak egybehangzó túlszabályozást az SCLC-A altípusban [33]. Érdekes módon a proteomikai adatok egyértelműen jelezték, hogy az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) és a légzési lánc elemeinek aktiválása erősen specifikus az SCLC-A-ra [33]. Nemrégiben leírták, hogy a MYC-et nem expresszáló sejtvonalak (ami jellemző SCLC-A esetében; 9, 13) jobban támaszkodnak az oxidatív anyagcserére [41], arra utalva, hogy az SCLC-A tumorok érzékenyek lehetnek az OXPHOS-gátlókra [42].

Az SCLC-N sejtvonalak, amelyek vizsgálatunkban túlnyomórészt szuszpenziós kultúrákat alkottak, egybehangzóan a sejtadhéziós útvonalak downregulációját mutatták [33]. A fehérjeszintű adatok elemzése rávilágított a DNS-replikáció és a transzkripció fokozott aktivitására és a citokin által közvetített jelátvitel depléciójára is ebben az altípusban [33]. Érdekes módon hasonló tendenciát írtak le egy olyan vizsgálatban, amely az SCLC és a normális szövetek közötti génextpressziós különbségekkel foglalkozik [43].



**1. ÁBRA.** Altípus-specifikus proteinek humán SCLC-sejtvonalak molekuláris altípusai szerint. Humán SCLC-sejtvonalaink részletes proteomikai elemzése lehetővé tette, hogy molekuláris altípusonként meghatározzuk a túlszabályozott altípus-specifikus proteineket. Ezek közül alcsoportonként 5-5, altípus-specifikus proteint meghatározó gént tüntettünk fel. Az ábra a Biorender© képszerkesztő program használatával készült

Az epitélszerű SCLC-P sejtvonalakban a lamellipodium-szerveződési útvonal túlszabályozását figyeltük meg (33), amely az EMT egyik döntő lépését jelenti, és a sejtek fokozott mozgékonyaságához és invazív képességéhez vezet (44). Ezen túlmenően a neurotrofin-jelátvitel túlszabályozása előrevetíti, hogy a poli(adenozin-difoszfát-ribóz) polimeráz (PARP) inhibitorok hatékony terápiás szerek lehetnek SCLC-P esetében, ahogyan azt korábban javasolták (18), mivel a PARP elhúzódó aktivációja hozzájárul a neurotrofinok által indukált neuronális halálhoz (45). Ezen túlmenően adataink arra utalnak, hogy a neurotrofin-szignalizáció közvetlen célzott kezelése megfelelő terápiás lehetőség a POU2F3 által vezérelt SCLC-ben (46).

Az SCLC-Y sejtvonalak egyértelműen meghatározott alcsoportot alkottak SCLC-mintáinkban. Proteomikai adatainkban a fehérjeacetiláció, a kromatinmódosítás (amely a hiszton-acetiltransferázok csökkent szintje által vezérelt) és a DNS-kettősszál-törés javítási útvonalak downregulációját, valamint a mitogénaktivált proteinkináz (MAPK-) kaskád és a Rho-guanozin-trifoszfát(GTP)áz jelátviteli tagok overexpresszióját is kimutattuk ebben az SCLC-Y altípusban (33). A Rho döntő fontosságú a YAP/foszfolipid-lizofoszfolipid transzpileráz(TAZ) aktivitáshoz (47), ezért az utóbbi útvonalak túlszabályozása várható a YAP1+ sejtvonalakban. Nemrégiben Caesar és munkatársai arról számoltak be, hogy SCLC-A-ban a MAPK-útvonal aktiválódása inkább gátló funkciót tölt be, szemben az SCLC-N/P sejtvonalakkal (48). Az SCLC-Y altípusból származó sejtvonalakat azonban ezek a szerzők nem vizsgálták. A YAP1 által vezérelt sejtvonalak adhéziós jellegével összhangban azt is megfigyeltük, hogy a foká-

lis adhézió, az extracelluláris mátrix (ECM) szerveződése és a sejt-szubsztrát protein útvonalak egységesen túlszabályozottak voltak az SCLC-Y alcsoportban, csakúgy, mint a peroxisómával és endocitózissal kapcsolatos fehérjék (33). Tlemsani és munkatársai leírták, hogy az SCLC-Y sejtvonalak magas natív immunprediszpozíciót mutatnak (49). Emellett ezek a sejtek rendelkeznek a legmagasabb antigénprezentáló funkcióval is, előrevetítve, hogy az SCLC-Y altípus érzékeny lehet az immunellenőrzőpont-gátlókra (49). Ezzel összhangban a citokin által közvetített jelátvitel és a gyulladásos válasz jellegzetes túlszabályozását is azonosítottuk ebben az altípusban (33).

Megjegyzendő, hogy az SCLC-Y altípushoz kapcsolódóan még mindig van ellentmondás, mivel a betegmintákban az SCLC-altípusok átfogó IHC- és szövettani elemzése nem azonosították a YAP1 által vezérelt különálló altípust. Ezzel szemben saját preklinikai proteomikai vizsgálatunk egyértelműen azonosított egy egyedi SCLC-Y altípust a vizsgált sejtvonalak között (33). Ennek megfelelően a 104 diagnosztikai jelentőségű fehérje jelentős hányada az SCLC-Y-hoz kapcsolódott. Az SCLC-Y legígéretesebb biomarkerei közé tartozik a glutation-peroxidáz 8 (GPX8), a proteinkináz D2 (PKD2) és az UFO, amelyek közül az UFO potenciálisan kimutatható a humán vérplazmában is (33). Ez klinikai jelentőségű, mivel a megfelelő szövetminták hiánya rávilágít a véralapú biomarkerek diagnosztikai relevanciájára. Valójában eddig csak egyetlen tanulmány tett kísérletet az altípus-specifikus véralapú biomarkerek panelének meghatározására (50). Tanulmányukban azonban a szerzők nem a fehérjék, hanem a keringő sejtmentes DNS diagnosztikai relevanciáját vizs-

gálták [50]. Ami a vizsgálatunkban azonosított potenciális SCLC-Y-markereket illeti, a GPX8 génexpressziója korábban korrelációt mutatott a YAP1 expressziójával SCLC-sejtvonalakban [51]. A PKD SCLC-ben betöltött szerepéről keveset tudunk, de egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a H69, H345 és H510 sejtvonalakban aktiválódik a proteinkináz C-függő útvonal aktiválásán keresztül [52]. Az AXL receptor-tirozin-kináz gén (amely az UFO fehérjét kódolja) a mezenhimális fenotípussal van kapcsolatban, és potenciális célpont az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor inhibitorokkal szembeni rezisztencia leküzdésére [53].

Adataink hat olyan fehérjét azonosítottak, amelyek az altípusok között figyelemre méltó különbségeket mutatnak a gyakoriságban, és amelyek az FDA által jóváhagyott gyógyszercélpontok is, nevezetesen a dopa-dekarboxiláz (DDC) (overexpresszált az SCLC-A-ban), az efrin A típusú receptor (EPHA2), az integrin alfa V (ITAV) és az integrin béta 1 (ITB1) (ezek az EPHA2, az integrin subunit alpha V (ITGAV) és az integrin subunit beta 1 (ITGB1) géneknek megfelelőek, és SCLC-Y-ban overexpresszáltak), a hiszton-deacetiláz 1 (HDAC1) (az SCLC-Y-ban alulszabályozott) és a KIT (az SCLC-P-ben túlszabályozott) [33] (1. ábra). Az ASCL1 magas szintjével rendelkező sejtek a DDC erősebb expresszióját is mutatták [11], míg az EPHA2-ről, egy nem NE markerről [29] korábban már leírták, hogy az SCLC-Y-ban túlszabályozott [49] (1. ábra). Az integrinek fokozott expressziója az SCLC-Y-ban hozzájárul a kemoterápiás rezisztenciához a kemoterápia által indukált apoptózis elnyomása révén [54]. Ezzel összhangban csoportunk korábban pozitív korrelációról számolt be a YAP1 fehérje mennyisége és a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia között SCLC-sejtvonalakban [17]. A közelmúltban beszámoltak a HDAC-gátlóval szembeni rezisztenciáról is az SCLC-Y-ban [55], amelyet a mi vizsgálatunkban a HDAC1 downregulációja előrevetített [33]. A KIT fehérje ismert SCLC-P-marker [56]. Fontos, hogy hipotézisünket, miszerint a fehérjék altípus-specifikus overexpressziója bizonyos gyógyszerekkel szembeni érzékenységet jelez, a CancerRxGene adatai alátámasztották [57]. Különösen azt erősítettük meg, hogy a KIT-et célzó gyógyszerek, mint például a pazopanib, potenciálisan megfelelőek a POU2F3-domináns SCLC-k ellen, míg a YAP1-domináns daganatok ellenállóbbak a vorinostattal szemben (amely a HDAC1-et célozza) [33]. Eredményeink alapul szolgálhatnak jövőbeli vizsgálatokhoz, azonban nagyobb SCLC-kohorszok proteomikai elemzése szükséges, lehetőleg homogén kezelési előzményekkel rendelkező betegek friss szövetmintáinak bevonásával, hogy megállapításainkat validálhassuk.

### **BCL-2 ÉS MCL1 EXPRESSZIÓJA ÉS GÁTLÁSA AZ ALTÍPUSOK VONATKOZÁSÁBAN**

A közelmúltban munkacsoportunk SCLC-sejtvonalakban vizsgálta a B-sejt-limfóma 2 (BCL-2) fehérjecsald tagjainak expresszióját. A vizsgált sejtvonalak a korábbiak alapján

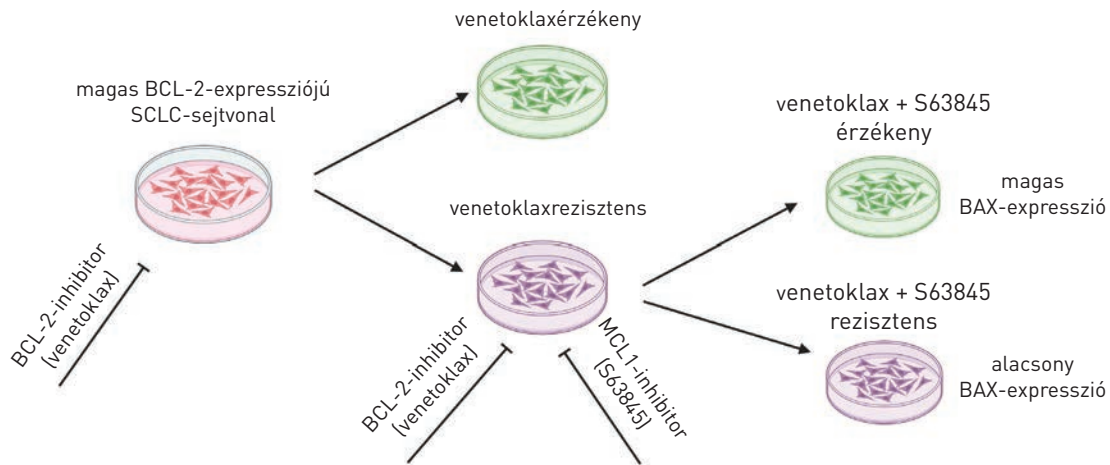
meghatározott négy alcsoport (SCLC-A, SCLC-N, SCLC-P és SCLC-Y) valamelyikébe voltak sorolhatók. Mivel a transzkripciós faktorok nehezen célozhatók, a célzott terápiás ágensek kifejlesztése ez idáig elmaradt SCLC-ben [58]. 1988-ban kimutatták, hogy a BCL-2 fehérje a sejthalállal szembeni rezisztencia révén elősegíti a carcinogenezist és a tumorok progresszióját [59]. A következő években számos fehérjével bővült e család, amelyek mindegyike részt vesz a sejtek apoptózisának szabályozásában, és egy vagy több BCL-2-homológia- (BH-) domént tartalmaz [60]. Az SCLC-k proteomikai profilalkotása a BCL-2 emelkedett szintjét mutatta ki, amelyet később fokozott ciszplatinrezisztenciával hoztak összefüggésbe [61]. Emellett a primer SCLC-tumorok és -sejtvonalak teljes genomjának szekvenálása arra utal, hogy a BCL-2 expressziója az újonnan meghatározott molekuláris altípusok között változhat, amely egy lehetséges altípus-specifikus terápiát határozhat meg [9].

A mieloid leukémia 1 (MCL1) fehérje a BCL-2 család másik tagja, amely a sejtek túlélését segíti elő azáltal, hogy megakadályozza a szerkezetileg hasonló, de proapoptotikus BCL-2-asszociált X protein (BAX) és BCL-2 antagonist/killer (BAK) aktiválódását a mitokondrium külső membránján [62]. A BCL-2 expressziójával ellentétben azonban, amely a BCL-2-inhibitorokkal szembeni nagyobb érzékenységhez vezet, az MCL1-et az ezen antagonistákkal szemben szerzett rezisztencia kritikus tényezőjeként azonosították [63].

Az elmúlt években a BCL-2 családdal interakcióba lépő inhibitorok megjelenése új gyógyszerarzenált biztosított a különböző malignitások, különösen a leukémiák kezelésére [64]. A venetoklax, az első FDA által jóváhagyott tiszta BCL-2-BH3-mimetikum drámai módon javította a betegek túlélését krónikus limfoid leukémiában (CLL) és akut mieloid leukémiában (AML). A venetoklax jelenteg preklinikai és klinikai vizsgálatok alatt áll szolid tumorokban is [65, 66]. Tekintettel a BCL-2 emelkedett expressziójára bizonyos SCLC-esetekben [67], a venetoklax más BCL-2-antagonistákkal együtt ígéretes lehetőség e betegek kezelésében [64]. Mindazonáltal a kezdeti biztató eredmények ellenére [58] az ezen inhibitorokra mutatott érzékenység mind a preklinikai modellekben, mind a korai fázisú klinikai vizsgálatokban elmentmondásos, még magas BCL-2-expresszió esetén is [64]. Az ezekkel az inhibitorokkal szembeni rezisztencia egyik fő mechanizmusa feltehetően az MCL1 overexpressziója, amely gátolja a BAX/BAK aktivációját [68, 69]. Tanulmányunkban a személyre szabott terápiás megközelítések kidolgozásának elősegítése érdekében meghatároztuk a BCL-2 expressziójának különbségeit a különböző SCLC-altípusok között, és vizsgáltuk a BCL-2-gátlással szembeni rezisztencia hátterében álló mechanizmusokat. Emellett a BCL-2/MCL1 kombinált gátlásának hatékonyságát is tanulmányoztuk *in vitro* és *in vivo*.

A BCL-2 molekulárisaltípus-specifikusságát elemezve az ASCL1- és POU2F3-domináns altípusokban széles körben emelkedett expressziós szintet találtunk [70]. Ez összhangban





**2. ÁBRA.** Az MCL1 és BCL-2 terápiás gátlása SCLC-ben. A magas BCL-2-expressziójú sejtvonalak nem mindegyike érzékeny a BCL-2-inhibitor-kezelésre. E rezisztens sejtvonalaknál az MCL1/BCL-2 kettős gátlás terápiás megközelítést kínálhat. Hangsúlyozandó, hogy e kettős gátlás terápiás hatékonysága a BAX gén kifejeződésétől függ. Az ábra a Biorender© képszerkesztő program használatával készült (SCLC: kissejtes tüdőrák, BCL-2: B-sejt-limfóma 2, MCL1: mieloid leukémia 1, BAX: BCL-2-asszociált X protein)

van mások eredményeivel, amelyek szerint az SCLC-A altípus nagymértékben függ a BCL-2 és az inzulinóma-asszociált protein 1 (INSM1) szintjétől [9, 18, 71, 72]. Ezen eredmények fényében a BCL-2 valóban potenciális altípus-specifikus terápiás célpontot jelenthet az SCLC ezen alcsoportja számára. Korábban a BCL-2-génexpresszió szintje korrelált a POU2F3 expressziójával is, azonban ezek az eredmények nem mutatkoztak szignifikánsnak korábbi tanulmányokban [9]. Figyelemre méltó, hogy vizsgálatunkban a BCL-2 szintje szignifikánsan megnövekedett az SCLC-P sejtekben mind RNS-, mind fehérjeszinten. A legújabb preklinikai munkák amellett érvelnek, hogy a POU2F3 expressziója is értékes lehet a PARP-gátlásra érzékeny tumorok azonosításában [18, 73]. Mivel a BCL-2 gyakran kölcsönhatásba lép a PARP-1-gyel, és így elnyomja a PARP-1-függő DNS-javítást [74], a BCL-2-PARP-1 kölcsönhatás célzott megszakítása ígéretes altípus-specifikus megközelítést jelenthet ezekben az esetekben.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a BCL-2 expressziója korrelál-e *in vitro* a venetoklax hatékonyságával, és azt találtuk, hogy bár a venetoklaxra érzékeny sejtvonalak többsége valóban az SCLC-A vagy SCLC-P altípusba tartozott, nem minden magas BCL-2-expressziójú sejtvonal reagált megfelelően a BCL-2 gátlására [70]. Ezzel összhangban Lochmann és munkatársai is azt találták, hogy az SCLC-k egy jelentős alcsoportja érzékeny a venetoklaxra [58]. Ezen eredmények új terápiás stratégiák lehetőségét vetítik előre, ugyanakkor a terápiarefrakter esetek és a dózist limitáló toxicitások komoly aggodalomra adnak okot. Ezt támasztja alá az is, hogy egy multicentrikus, I/II-es fázisú vizsgálatot (NCT04543916), amelynek célja a visszaeső vagy refrakter SCLC-ben szenvedő betegeknél az orális venetoklax II.

fázisú dózisének meghatározása volt, a fellépő toxicitások miatt leállítottak. E problémák leküzdése érdekében a rezisztencia fő mechanizmusainak meghatározása a megfelelő beteg kiválasztással együtt döntő fontosságú. Fontos eredményünk, hogy mind az MCL1-overexpresszió, mind az alacsony BAX-szint jellemző volt a venetoklaxrezisztenciára SCLC-ben, míg a forbol-12-mirisztát-13-acetát indukált protein (NOXA), BCL-2-asszociált sejthalál-agonista (BAD), BCL2-related ovarian killer protein (BOK), BH3-interacting domain death agonist (BID), BAK1, BCL-XL és BCL-2L12 szintjei nem befolyásolták a terápiás hatékonyságot [70]. Hasonló következtetésekre jutottak Punnoose és munkatársai multiplex mielómában, ahol az MCL1 overexpressziója rezisztenciát eredményezett a venetoklax és a navitoklax BCL-2-gátlókkal szemben [75]. Érdekes módon előzetes elemzésük arra is utalt, hogy a BCL-XL fokozott expressziója – a BCL-2-höz képest – a venetoklaxkezeléssel szembeni csökkent érzékenységgel járhat együtt [75], amelyet a mi vizsgálatunkban nem sikerült validálni. Ehelyett eredményeink szerint egy másik, a terápiás rezisztenciával összefüggésbe hozható fehérjének mutatkozott a proapoptotikus BAX, amely az apoptotikus szignál hatására oligomerizáció megy keresztül, és lyukakat képez a külső mitokondriális membránban [76, 77]. Ezzel elősegíti a citokróm c és más proapoptotikus molekulák citoplazmába való bejutását, aktiválja a kaspázokat, és a sejtek apoptózisához vezet [76, 77]. Akut limfoid leukémiában (ALL) végzett korábbi vizsgálatok szintén arra utalnak, hogy a BAX-deficiencia és a missense BAX-mutációk szerzett venetoklaxrezisztenciát indukálnak [68, 78].

Mivel az emelkedett MCL1-szintek magas BCL-2-expresszióval rendelkező SCLC-sejtvonalakban venetoklax-

rezisztenciával társulnak, az MCL1 célzott kezelése az S63845-tel szintén megvalósítható terápiás megközelítést jelenthet a refrakter esetekben (2. ábra). Azonban nem minden venetoklaxrezisztens, BCL-2-expresszálo, túlszabályozott MCL1-gyel rendelkező sejtvonal reagált megfelelően az MCL1 gátlására sem, és meglepő módon az MCL1-expresszió nem korrelált az S63845 hatékonyságával. Annak érdekében, hogy legyőzzük a terápiás rezisztenciát ezekben a kettős rezisztens sejtvonalakban, a két célzott hatóanyagot egyszerre alkalmaztuk (2. ábra). Az MCL1 és a BCL-2 kettős gátlásával kapcsolatban több tanulmány is született (79). Az S63845 és a venetoklax kombinációja erős aktivitást mutatott orrgarat-karcinóma (80), AML (81) és köpenysejtes limfóma (82) esetében. Ezzel összhangban egy nemrégiben SCLC-sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálat szintén az S63845 és a navitoklax, egy kettős BCL-XL- és BCL-2-gátló közötti potenciális szinergizmusra utalt (79). Ugyanakkor a navitoklax és az S63845 terápiás tartománya további *in vivo* vizsgálatokban szűknek bizonyult (79). Összességében a venetoklax és az S63845 kettős alkalmazása továbbra is ellentmondásos maradt SCLC-ben. Fenti munkánk azt mutatja, hogy a BCL-2 és az MCL1 egyidejű gátlása az említett két terápiás szerrel szinergista a kettős rezisztens SCLC-sejtvonalak egy alcsoportjában (70) (2. ábra). Emellett azt is megállapítottuk, hogy a venetoklax/S63845 kombináció kifejezett tumorellenes aktivitást mutat SHP77 xenograftmodellben, amely mindkét gátlóval szemben önmagában rezisztens (70). Ez összhangban van azokkal a vizsgálatokkal, amelyek a venetoklax MCL1-gátlókkal kombinált hatékonyságáról számoltak be mielómamodellekben (70, 83–85). Fontos, hogy *in vivo* modellünkben nem észleltük a toxicitás jeleit (70). Figyelemre méltó, hogy SCLC-mintáink egy része még a BCL-2/MCL1 kettős célzással szemben is rezisztens maradt (70) (2. ábra).

Bár mind a BCL-2, mind az MCL1 inhibitorai klinikailag elérhetőek és viszonylag jól tolerálhatók különböző tumormodellekben (84, 86, 87), a venetoklax és az S63845 egyidejű alkalmazását még nem próbálták ki klinikai vizsgálatokban. A jelenlegi és a korábbi vizsgálatokban nem észleltek dóziszfüggő toxicitást (70, 84), ugyanakkor a BCL-2- és MCL1-gátlók egyidejű alkalmazása egyes esetekben még mindig növelheti a toxicitási arányokat. Emellett a kettős gátlás hatékonysága nem minden sejtvonalban következetes, és nem minden tumor reagál határozottan a BCL-2/MCL1 gátlásra (84). Ezért a megfelelő betegkiválasztás mellett a terápiás rezisztenciára vonatkozó biológiai jellemzők értékelése alapvető fontosságú lesz a jövőbeli klinikai vizsgálatok esetében. Saját vizsgálatunkban azt mutattuk be,

hogy a két inhibitor kombinációja BAX-függő módon kedvez az apoptózisnak (70) (2. ábra). Összefoglalva, az AML (81) és a multiplex mielóma (84) esetében kimutatott korábbi eredményekkel összhangban azt találtuk, hogy a venetoklax/S63845 kombináció hatékony gátlásához SCLC-ben is kötelező az intakt és aktivált BAX (70). A BCL-2/MCL1/BAX kölcsönhatás részletes biológiai jellemzőit még meg kell határozni, azonban a BAX-függő hatékonyság egyik lehetséges oka magának a BAX-nak a proapoptotikus tulajdonságaiban rejlik. A kettős gátlás ugyanis azáltal indukálja a sejthalált, hogy lehetővé teszi a BAX számára, hogy heterokomplexeket képezzen a BAK-kal, amely az apoptózis egyik döntő lépése (84).

## ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink hozzájárulnak a molekuláris altípusok biológiai és klinikai relevanciájának felderítéséhez. Az SCLC molekuláris altípusok szerinti osztályozását nagyszámú sebészeti mintán validáltuk, és megállapítottuk, hogy az ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 eltérő expressziója egyedi SCLC-altípusokat határoz meg. IHC-elemzéseink azonban nem különböztettek meg YAP1 által vezérelt altípust. Ehelyett egy SCLC-QN altípust azonosítottunk, amelyet a négy transzkripciós szabályozó alacsony expressziója jellemez. Továbbá megállapítottuk, hogy a magas POU2F3-expresszió jobb túléléssel társult az egyváltozós elemzésben, míg a magas ASCL1-expresszió független negatív prognosztikai tényezőnek bizonyult sebészileg ellátott SCLC-ben. Mindemellett az első nagyszabású proteomikai vizsgálatot végeztük humán SCLC-sejtvonalakon az újonnan meghatározott molekuláris altípusokra vonatkozóan. Fontos, hogy ebben az esetben egy különálló, YAP1 által vezérelt altípust is meg lehetett különböztetni sajátos proteomikai jellemzőkkel. Ezen altípusok átfogó proteomikai profilalkotása altípus-specifikus terápiás lehetőségeket azonosított. Emellett számos potenciális IHC- és véralapú biomarkert is azonosítottunk, amelyek a jövőben megkönnyíthetik az altípusok diagnózist. További vizsgálatunkban feltártuk a BCL-2-expresszió altípus-specifikus jellegét és fényt derítettünk a venetoklaxrezisztencia mechanizmusára humán SCLC-ben. Vizsgálatunk igazolta, hogy a BCL-2 és az MCL1 egyidejű célzása hatékony stratégia a SCLC növekedésének gátlására *in vitro* és *in vivo*. Mindazonáltal a kettős BCL-2/MCL1 gátlás jogosultsága SCLC-ben további preklinikai validálást igényel, mielőtt klinikai tesztelésére sor kerülne. Összességében eredményeink hozzájárulhatnak az altípus-specifikus, személyre szabott terápiás megközelítések kidolgozásához SCLC-ben.

## IRODALOM

1. Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer* 17:765, 2017
2. Kahnert K, Kauffmann-Guerrero D, Huber RM. SCLC – State of the art and what does the future have in store? *Clin Lung Cancer* 17:325–333, 2016
3. Schwendenwein A, Megyesfalvi Z, Barany N, et al. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: therapeutic implications. *Mol Ther Oncolytics* 20:470–483, 2021
4. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, et al. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* 7:3, 2021
5. Ganti AKP, Loo BW, Bassetti M, et al. Small Cell Lung Cancer, Version 2.022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 19:1441–1464, 2021
6. Megyesfalvi Z, Gay CM, Popper H, et al. Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin* 2023, doi: 10.3322/caac.21785
7. Gong J, Salgia R. Managing patients with relapsed small-cell lung cancer. *J Oncol Pract* 14:359–366, 2018
8. Taniguchi H, Sen T, Rudin CM. Targeted therapies and biomarkers in small cell lung cancer. *Front Oncol* 10:741, 2020
9. Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer* 19:289–297, 2019
10. Baine MK, Hsieh MS, Lai WV, et al. SCLC subtypes defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A comprehensive immunohistochemical and histopathologic characterization. *J Thorac Oncol* 15:1823–1835, 2020
11. Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, et al. ASCL1 and NEUROD1 reveal heterogeneity in pulmonary neuroendocrine tumors and regulate distinct genetic programs. *Cell Rep* 16:1259–1272, 2016
12. Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, et al. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res* 45:2924–2930, 1985
13. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 524:47–53, 2015
14. Mollaoglu G, Guthrie MR, Bohm S, et al. MYC drives progression of small cell lung cancer to a variant neuroendocrine subtype with vulnerability to Aurora kinase inhibition. *Cancer Cell* 31:270–285, 2017
15. Huang YH, Klingbeil O, He XY, et al. POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes Dev* 32:915–928, 2018
16. Caesar R, Egger JV, Chavan S, et al. Genomic and transcriptomic analysis of a library of small cell lung cancer patient-derived xenografts. *Nat Commun* 13:2144, 2022
17. Megyesfalvi Z, Barany N, Lantos A, et al. Expression patterns and prognostic relevance to subtype-specific transcription factors in surgically resected small-cell lung cancer: an international multicenter study. *J Pathol* 257:674–686, 2022
18. Gay CM, Stewart CA, Park EM, et al. Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell* 39:346–360, 2021
19. Bai R, Lv Z, Xu D, et al. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomarker Res* 8:34, 2020
20. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 17:e542–e551, 2016
21. McColl K, Wildey G, Sakre N, et al. Reciprocal expression of INSM1 and YAP1 defines subgroups in small cell lung cancer. *Oncotarget* 8:73745–73756, 2017
22. Asamura H, Kameya T, Matsuno Y, et al. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. *J Clin Oncol* 24:70–76, 2006
23. Welter S, Aigner C, Roessel C. The role of surgery in high grade neuroendocrine tumours of the lung. *J Thorac Dis* 9:S1474–S1483, 2017
24. Furuta M, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi H, et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in surgically resected small cell lung cancer (HOT1702). *Oncologist* 24:e1172–e1179, 2019
25. Kosari F, Ida CM, Aubry MC, et al. ASCL1 and RET expression defines a clinically relevant subgroup of lung adenocarcinoma characterized by neuroendocrine differentiation. *Oncogene* 33:3776–3783, 2014
26. Dora D, Rivard C, Yu H, et al. Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution. *Mol Oncol* 14:1947–1965, 2020
27. Gazdar A. Molecular phenotypes of SCLC, in International Association for the Study of Lung Cancer – 19th World Conference on Lung Cancer. JTO: Toronto, September 23–26, 2018
28. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med* 7:302ra136, 2015
29. Zhang W, Girard L, Zhang YA, et al. Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Transl Lung Cancer Res* 7:32–49, 2018
30. Picard Leblanc G, Blais N, Tehfe M, et al. Prognostic impact of paraneoplastic syndromes in patients with small cell lung cancer, real-world data. *J Clin Oncol* 37:e20082, 2019
31. Ito T, Matsubara D, Tanaka I, et al. Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumors. *Cancer Sci* 107:1527–1538, 2016
32. Thng DKH, Toh TB, Chow EK. Capitalizing on synthetic lethality of MYC to treat cancer in the digital age. *Trends Pharmacol Sci* 42:166–182, 2021
33. Szeitz B, Megyesfalvi Z, Woldmar N, et al. In-depth proteomic analysis reveals unique subtype-specific signatures in human small-cell lung cancer. *Clin Transl Med* 12:e1060, 2022
34. Denny SK, Yang D, Chuang CH, et al. Nfib promotes metastasis through a widespread increase in chromatin accessibility. *Cell* 166:328–342, 2016
35. Arriola E, Canadas I, Arumi M, et al. Genetic changes in small cell lung carcinoma. *Clin Transl Oncol* 10:189–197, 2008
36. Mori N, Yokota J, Akiyama T, et al. Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 5:1713–1717, 1990
37. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* 28:3–13, 2001
38. Ghandi M, Huang FW, Jane-Valbuena J, et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569:503–508, 2019
39. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, et al. Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 14:549–561, 2017
40. Guillemot F, Hassan BA. Beyond proneural: emerging functions and regulations of proneural proteins. *Curr Opin Neurobiol* 42:93–101, 2017
41. Cargill KR, Stewart CA, Park EM, et al. Targeting MYC-enhanced glycolysis for the treatment of small cell lung cancer. *Cancer Metab* 9:33, 2021
42. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Stoll G, et al. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *Int J Cancer* 146:10–17, 2020
43. Liao Y, Yin G, Wang X, et al. Identification of candidate genes associated with the pathogenesis of small cell lung cancer via integrated bioinformatics analysis. *Oncol Lett* 18:3723–3733, 2019
44. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178–196, 2014
45. Hwang JJ, Choi SY, Koh JY. The role of NADPH oxidase, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADP ribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5. *J Neurochem* 82:894–902, 2002
46. Griffin N, Faulkner S, Jobling P, et al. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacol Res* 135:12–17, 2018
47. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474:179–183, 2011
48. Caesar R, Hulton C, Costa E, et al. MAPK pathway activation selectively inhibits ASCL1-driven small cell lung cancer. *iScience* 24:103224, 2021
49. Tlemsani C, Pongor L, Elloumi F, et al. SCLC-CellMiner: A resource for small cell lung cancer cell line genomics and pharmacology based on genomic signatures. *Cell Rep* 33:108296, 2020
50. Chemi F, Pearce SP, Clipson A, et al. cfDNA methylome profiling for detection and subtyping of small cell lung cancers. *Nat Cancer* 3:1260–1270, 2022
51. Horie M, Saito A, Ohshima M, et al. YAP and TAZ modulate cell phenotype in a subset of small cell lung cancer. *Cancer Sci* 107:1755–1766, 2016
52. Paolucci L, Rozengurt E. Protein kinase D in small cell lung cancer cells: rapid activation through protein kinase C. *Cancer Res* 59:572–577, 1999
53. Byers LA, Diao L, Wang J, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 19:279–290, 2013
54. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5:662–668, 1999
55. Zhao P, Sun X, Li H, et al. c-Myc targets HDAC3 to suppress NKG2DL expression and innate immune response in N-type SCLC through histone deacetylation. *Cancers [Basel]* 14:457, 2022
56. Chan JM, Quintanal-Villalonga A, Gao VR, et al. Signatures of plasticity, metastasis, and immunosuppression in an atlas of human small cell lung cancer. *Cancer Cell* 39:1479–1496, 2021

57. Yang W, Soares J, Greninger P, et al. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 41:D955–961, 2013
58. Lochmann TL, Floros KV, Naseri M, et al. Venetoclax is effective in small-cell lung cancers with high BCL-2 expression. *Clin Cancer Res* 24:360–369, 2018
59. Schenk RL, Strasser A, Dewson G. BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target. *Biochem Biophys Res Commun* 482:459–469, 2017
60. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 8:180002, 2018
61. Byers LA, Wang J, Nilsson MB, et al. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov* 2:798–811, 2012
62. Anstee NS, Bilardi RA, Ng AP, et al. Impact of elevated anti-apoptotic MCL-1 and BCL-2 on the development and treatment of MLL-AF9 AML in mice. *Cell Death Differ* 26:1316–1331, 2019
63. Pan R, Ruvoilo VR, Wei J, et al. Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (-)JBI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia. *Blood* 126:363–372, 2015
64. Lochmann TL, Bouck YM, Faber AC. BCL-2 inhibition is a promising therapeutic strategy for small cell lung cancer. *Oncoscience* 5:218–219, 2018
65. Juarez-Salcedo LM, Desai V, Dalia S. Venetoclax: evidence to date and clinical potential. *Drugs Context* 8:212574, 2019
66. Roberts AW, Stilgenbauer S, Seymour JF, et al. Venetoclax in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 23:4527–4533, 2017
67. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, et al. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol* 145:1036–1040, 1994
68. Tahir SK, Smith ML, Hessler P, et al. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* 17:399, 2017
69. Zhang Q, Riley-Gillis B, Han L, et al. Activation of RAS/MAPK pathway confers MCL-1 mediated acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in acute myeloid leukemia. *Signal Transduct Target Ther* 7:51, 2022
70. Valko Z, Megyesfalvi Z, Schwendenwein A, et al. Dual targeting of BCL-2 and MCL-1 in the presence of BAX breaks venetoclax resistance in human small cell lung cancer. *Br J Cancer* 128:1850–1861, 2023
71. Augustyn A, Borromeo M, Wang T, et al. ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14788–14793, 2014
72. Costanzo F, Martinez Diez M, Santamaria Nunez G, et al. Promoters of ASCL1- and NEUROD1-dependent genes are specific targets of lurbnectin in SCLC cells. *EMBO Mol Med* 14:e14841, 2022
73. Knelson EH, Patel SA, Sands JM. PARP inhibitors in small-cell lung cancer: rational combinations to improve responses. *Cancers (Basel)* 13:727, 2021
74. Dutta C, Day T, Kopp N, et al. BCL2 suppresses PARP1 function and nonapoptotic cell death. *Cancer Res* 72:4193–4203, 2012
75. Punnoose EA, Levenson JD, Peale F, et al. Expression profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 predicts pharmacological response to the BCL-2 selective antagonist venetoclax in multiple myeloma models. *Mol Cancer Ther* 15:1132–1144, 2016
76. Bose P, Gandhi V, Konopleva M. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leuk Lymphoma* 58:1–17, 2017
77. Yue X, Chen Q, He J. Combination strategies to overcome resistance to the BCL2 inhibitor venetoclax in hematologic malignancies. *Cancer Cell Int* 20:524, 2020
78. Fresquet V, Rieger M, Carolis C, et al. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood* 123:4111–4119, 2014
79. Yasuda Y, Ozasa H, Kim YH, et al. MCL1 inhibition is effective against a subset of small-cell lung cancer with high MCL1 and low BCL-XL expression. *Cell Death Dis* 11:177, 2020
80. Wang Y, Wang Y, Fan X, et al. ABT-199-mediated inhibition of Bcl-2 as a potential therapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 503:1214–1220, 2018
81. Moujalled DM, Pomilio G, Ghiurau C, et al. Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 33:905–917, 2019
82. Prukova D, Andera L, Nahacka Z, et al. Cotargeting of BCL2 with venetoclax and MCL1 with S63845 is synthetically lethal in vivo in relapsed mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 25:4455–4465, 2019
83. Algarin EM, Diaz-Tejedor A, Mogollon P, et al. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica* 105:e116–e120, 2020
84. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, et al. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis* 11:316, 2020
85. Siu KT, Huang C, Panaroni C, et al. BCL2 blockade overcomes MCL1 resistance in multiple myeloma. *Leukemia* 33:2098–2102, 2019
86. Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538:477–482, 2016
87. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19:202–208, 2013