

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**ErbB receptor tirozin kinázok és  $\beta$ 1-integrin molekuláris kölcsönhatásai:  
tumor terápia vonatkozások**

Dr. Petrás Miklós

Témavezető: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora  
Dr. Klekner Álmos, Ph.D.



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2013

**ErbB receptor tirozin kinázok és  $\beta$ 1-integrin molekuláris kölcsönhatásai:  
tumor terápiás vonatkozások**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Petrás Miklós

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora  
Dr. Klekner Álmos, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora  
Dr. Bugyi Beáta, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. május 3.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Jóna István, az MTA doktora  
Dr. Tóvári József, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora  
Dr. Bugyi Beáta, Ph.D.  
Prof. Dr. Jóna István, az MTA doktora  
Dr. Tóvári József, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. május 3.

## Bevezetés

A malignus daganatok kezelése még napjainkban is sokszor leküzdhetetlen nehézségekbe ütközik az egyre szélesedő diagnosztikus és terápiás lehetőségek ellenére. 2008-ban 12.7 millió új tumoros esetet jelentettek világszerte, ami az előrejelzések szerint ~68%-os növekedést mutatva 21 millió felé fog emelkedni 2030-ig. Továbbá, a központi idegrendszer daganatai tumor mortalitás tekintetében - az elmúlt évtizedekben drámai incidencia növekedést mutatva (~300%) - jelenleg a második helyen állnak a 35 év alatti populációban.

Ezen elszomorító adatok hátterében a daganatok terápia rezisztenciája és akár a kezelés közben kialakuló metasztatizáló képességük okolható. Az elmúlt években a képalkotó és molekuláris diagnosztikai eljárásokban (korai diagnózis), sebészeti technikában és adjuváns kemoterápiában (tumor specifikus terápia) elért átfogó fejlődés ellenére, a tumorok csökkent kemo- és sugárérzékenysége, illetve előrehaladó metasztatizáló képessége gyakran hátráltatta az áttörő terápiás eredményeket.

A terápiás nehézségek áthidalására számos tanulmányt folytattak a tumorigenezis pontosabb megértése céljából, amelyek felvetették a növekedési faktor receptorok - köztük az ErbB fehérjék - fokozott expressziójának, gén amplifikációjának és mutációinak szerepét a tumorok proliferációjában és kifejlődő terápia rezisztenciájában. Ezen molekulák mitogén potenciáljának felfedezését követően, az ErbB I. típusú tirozin kináz receptor család részletes és mélyreható elemzésen esett át. Igazolták ligand kötődés által stimulált homo- és heterodimer képzési képességüket, amely a tirozin oldalláncaik transzfoszforilációján és intracelluláris szignalizációs molekulák aktiválódásán keresztül nagymértékben befolyásolja a sejtek életét és sorsát. Bizonyítást nyert, hogy heterodimerizációs tendenciájuk - homodimerizációs képességükön túl - kiterjeszti transzfoszforilációs dinamikájukat, és sokkal erősebb mitogén transzmembrán szignalizációhoz vezet.

Napjainkra számos tanulmány szolgáltatott bizonyítékot a tirozin kináz receptorok és egyes sejtadhéziós molekulák kölcsönhatásának terápia rezisztenciában feltételezett szerepére. Ismerve, hogy primeren invazív daganatok távoli metasztázisai új lokalizációjukban érdekes módon jól elkülönülnek környezetüktől - így virtuálisan elvesztve eredeti infiltratív képességüket - a jelenség hátterében egyedi, szerv- és tumor specifikus sejtadhéziós molekulák, illetve extracelluláris molekulák kölcsönhatásai feltételezhetőek, amely ismételten felveti a "sejt adhézió által közvetített terápia rezisztencia" elméletét.

## **Az ErbB receptorok és integrinek molekuláris kölcsönhatásai**

A tumor szuppresszorok és onkogének módosulásai kritikus első lépésként állnak a malignus transzformáció hátterében. Ebben a tekintetben, az ErbB tirozin kináz receptor család (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4) jelátvitelét kiterjedten tanulmányozták. Igazolták, hogy egyes tumor sejtek többfajta ErbB fehérjét expresszálnak, amelyek homo- és heterodimereket képeznek egymással. Felismerésre került, hogy a ligand kötődés által indukált dimerizáció a receptorok transzaktivációjához és szerteágazó szignalizációs utak aktiválásához vezet.

Az ErbB molekulák asszociációs mintázata mellett a sejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) között fennálló kapcsolat is jelentős szereppel bír a tumorok kialakulásában és a sejtek túlélésében. A sejtadhéziós molekulák között az integrinek képezik az egyik legdinamikusabb csoportot, amelyektől kiinduló jelátvitel révén a daganatsejtek képessé válnak elszakadni környezetüktől, és biztosítják túlélésüket idegen környezetben is. Az integrinek evolúciósan ősi fehérjék, amelyek két alegységből ( $\alpha/\beta$ ) épülnek fel és más sejtadhéziós/ECM molekulákhoz vagy specifikus vér proteinekhez kapcsolódnak. Ezidáig 18 különböző  $\alpha$  és 8  $\beta$  láncot azonosítottak, amelyek 24 különböző  $\alpha\beta$  heterodimert képezhetnek.

Az ErbB receptor család három fő szignalizációs útvonala a Ras/MAPK, a PI-3K/Akt és a PLC- $\gamma$ /PKC jelátviteli út. Ezek közül a PI-3K/Akt útvonal részt vesz a sejtnövekedés, az invázió és az anti-apoptotikus folyamatok szabályozásában; továbbá bizonyítást nyert, hogy a PI-3K fehérje leszabályozása az egyik leggyakoribb funkció-vesztéssel járó mutáció glioblastomákban, amely a trastuzumab rezisztencia kialakulásában is szereppel bírhat.

A sejtek ECM mentén történő vándorlása során az integrinek számos, strukturális/szignalizációs feladattal rendelkező receptorral alkotnak multimerikus klasztereket. Az ezen ún. fokális adhéziós komplexekből kiinduló jelek a fokális adhéziós kináz (FAK) foszforilációját eredményezik, illetve aktiválják a PI-3K/Akt-PKB jelátviteli útvonalat, amely a sejtek túlélésében játszik fontos szerepet. Az astrocytomákon végzett legújabb kutatások pedig megerősítették, hogy a FAK aktivációja korrelál és kolokalizációt mutat a sejtek ErbB1, illetve  $\alpha 5\beta 1$  integrin expressziójával, mely újabb bizonyítékot szolgáltat az ErbB fehérjék és az integrinek együttműködésére humán malignus astrocytomákban.

### **Az ErbB receptor kölcsönhatások szerepe a tumorok kemo- és sugárrezisztenciájában**

Az ErbB család tagjai a tumoros transzformációban résztvevő növekedési faktor receptorok egyik legfontosabb képviselői, mivel amplifikációjuk, fokozott expressziójuk, illetve mutációik gyakran a daganatok kialakulásának első lépcsőfokaként jelentkeznek.

*Kóros ErbB2 jelátvitel emlőtumorokban*

Az ErbB2 amplifikációját legelőször humán emlő és petefészek daganatokban írták le, de fokozott expressziója bizonyítást nyert más malignus betegségek esetén is. Az ErbB2 fehérje patogén funkciójának feltérképezését követően napjainkra a trastuzumab (rekombináns, humanizált ErbB2 ellenes antitest) bevonult a metasztatizáló emlőtumorok kezelésén túl a neoadjuváns protokollokba is. A molekuláris kölcsönhatásokban és szignalizációs folyamatokban bekövetkező számos dokumentált változás (ErbB2 internalizáció, leszabályozódás vagy mono-ubikvitináció; PTEN aktiváció; fokozott p27<sup>kip1</sup> és csökkent ciklin D1/ciklin-dependens kináz 2 aktiváció; MAPK/PI-3K inaktiváció) támasztotta alá a trastuzumab *in vitro* anti-proliferatív hatásmechanizmusát, míg előremutató kutatások azt bizonyítják, hogy az *in vivo* inhibitoros hatás kifejeződésében az antitest-függő celluláris citotoxicitás bír döntő jelentőséggel. Bár a trastuzumab klinikai alkalmazása drámaian javította a terápia kimenetelét ErbB2 pozitív emlőtumorban szenvedő betegekben, a siker még nem teljes, mivel a kialakuló rezisztencia meglehetősen gyakorinak bizonyult; a kezdeti hatásosság 30-50%-os, de 6-9 hónap kezelést követően a kezdetben jól reagáló betegek jelentős részében is relapszus jelentkezik. Számos további mechanizmus szerepe merült fel a trastuzumab rezisztencia hátterében, úgymint EGF-szerű ligandok autokrin termelődése, az IGF-I receptor útvonal aktiválódása, és a trastuzumab epitópjának MUC-4/szialomucin vagy CD44/hialuronsav komplexek által történő elfedése. A viszonylag gyakori trastuzumab rezisztencia hátterében álló folyamatok tehát rendkívül szerteágazónak tűnnek és esetről esetre is változnak, ami nagymértékben limitálja ezen új terápiás lehetőség hatásfokát.

*Kóros ErbB1 jelátvitel astrocytomákban*

Az ErbB receptor család felfedezése óta számos tanulmány bizonyította az ErbB1 receptor megváltozott jelátvitelének szerepét a gliomagenezis hátterében. A majdnem kizárólag temozolomid és radioterápia kombinálásán alapuló adjuváns kezelés mellett a legújabb ajánlások már magukban foglalják ErbB1 ellenes gyógyszerek alkalmazását is. Az  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin szignalizáció gátlása cilengitide-del (RGD mimetikus peptid) szintén klinikai fázisba ért, azonban a pozitív kimenetel inkább az endothelre és a vaszkularizációra kifejtett hatásnak volt tulajdonítható. Továbbá, preklinikai tanulmányok jelenleg PI-3K szignalizációs inhibitorok alkalmazásán és így a PI-3K/Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$  jelátviteli útvonal gátlásán keresztül a kemoterápia indukált apoptózis érzékenyítését veszik célba. Az astrocytoma miatt érintett betegek túlélése azonban továbbra is elszomorítóan alacsony, és a relapszus általában

egy éven belül jelentkeznek. A besugárzással szemben kialakuló rezisztencia hátterében számos folyamat szerepét mutatták ki, a jelenség szabályozása azonban még jelenleg sem pontosan ismert. A hatékonyabb DNS javító mechanizmusok mellett az ErbB proteinek szerepe is felmerült az ionizáló sugárzásra adott sejtszintű válaszban, és igazolást nyert az ErbB1 fokozott expressziója és a megnövekedett sugárrezisztencia kapcsolata is.

Az ErbB-integrin kölcsönhatást igazoló eredmények alapján az újabb terápiás stratégiák egyre inkább a sejtadhézió által mediált terápia rezisztenciára fókuszálnak, mivel a malignus gliomák kezelésében a legnagyobb kihívás a lokális tömegnövekedésen túl a tumor nagyfokú infiltráló képességéből adódik. Több kutatás bizonyította, hogy a PI-3K/Akt szignalizációnak kulcsfontosságú szerepe van a megnövekedett hatékonyságú DNS javító mechanizmusokban, az ErbB1 aktiváción keresztül kifejlődő sugárrezisztenciában, illetve a  $\beta 1$  integrin modulálta gliasejt adhézióban és túlélésben. A legújabb eredmények alapján pedig a  $\beta 1$  integrin inhibitorok a radioterápia potenciálisan ígéretes érzékenyítőjének bizonyultak *in vitro*.

Mindezek alapján tehát az ErbB1- $\beta 1$  integrin interakció fontos szerepet tölthet be a megnövekedett sugárrezisztenciában, és új diagnosztikus és terápiás célpontként szolgálhat.

### **Membrán fehérjék multi-molekuláris kölcsönhatásainak analízise**

A molekuláris átrendeződések nyomonkövetésére az egyik legjobb módszer a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérése, amely az 1-10 nm tartományban képes az intra/intermolekuláris távolságok becslésére. A sejt felszíni molekulák asszociációinak vizsgálatára áramlási citometriai és mikroszkópos FRET eljárásokat fejlesztettek ki. Az áramlási citometriai technika (Flow Cytometric FRET, FCET) sejtek ezreinek FRET eloszlásáról szolgáltat statisztikailag megbízható adatokat, míg a mikroszkópos FRET mérések statisztikailag kevésbé pontosak, azonban alkalmasak a membrán fehérjék sejt felszíni heterogenitásának és kölcsönhatásának feltárására akár egyetlen sejtben is.

Az onkogenezisben résztvevő molekuláris kölcsönhatások szerepe azonban sokkal megbízhatóbban elemezhető kölcsönös interakcióik vizsgálatával, ezért két különböző molekuláris interakció (anti)korrelációjának meghatározása nagymértékben növelhetné tudásunkat. Továbbá, az ErbB és integrin molekulák molekuláris kölcsönhatása különbözhet az egyedi tumorokban *in situ*, ami nagymértékben meghatározhatja a terápia hatékonyságát és a betegség kimenetelét. Az egyre fejlődő FRET technikák mára már elérték a molekuláris kölcsönhatások szövettani metszetekben történő mérésének potenciális lehetőségét, melyek összevetése a klinikummal felveti a lehetőségét annak, hogy a betegeket prognosztikailag eltérő csoportokba soroljuk és az eredmények alapján optimalizált terápiát alkalmazhassunk.

## Célkitűzések

Az integrineknek az ErbB receptor vezérelt transzmembrán jelátvitelben kifejtett szerepéről közölt adatokra alapozva elsőként az ErbB2 és a  $\beta 1$  integrin kölcsönhatásának vizsgálatát tűztük ki célul, tekintetbe véve az interakció esetleges funkcionális jelentőségét trastuzumab rezisztenciában. Vizsgálatainkkal célunk volt, hogy:

- meghatározzuk az ErbB2 és a  $\beta 1$  integrin kölcsönhatásának mértékét ErbB2 pozitív tumor sejtvonalakon, és
- összehasonlítsuk az ErbB2 és  $\beta 1$  integrin molekulák expressziós mintázatát, valamint homo- és heteroasszociációjuk mértékét trastuzumab érzékeny és rezisztens tumor sejtvonalakon.

Mivel a molekuláris kölcsönhatásokat nagymértékben befolyásolhatja a szomszédos molekulák hatása - különösen a multi-molekuláris komplexeket tartalmazó szignalizációs membrán doménekben (tutajokban) - a multi-molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára egy új eljárás, a kétoldali FRET kifejlesztését tűztük ki célul, hogy:

- meghatározzuk három tetszőlegesen megválasztott molekulából felálló két molekula-pár kölcsönhatását, és
- feltérképezzük az ErbB2 homoasszociáció és az ErbB2 -  $\beta 1$  integrin heteroasszociáció korrelációját trastuzumab érzékeny és rezisztens sejtvonalakon.

Az astrocytoma sejtek túlélésében és adhéziójában az integrinek növekedési faktor receptor jelátvitelt moduláló hatásáról publikált adatok alapján az ErbB1 -  $\beta 1$  integrin kölcsönhatás vizsgálatát tűztük ki célul klinikai mintákon *in situ* és sejtes modell rendszereken *in vitro*. Vizsgálatainkkal célunk volt:

- meghatározni a 7-es kromoszóma és erbB1 gén többlet okozta sugárrezisztencia mértékét és molekuláris hátterét U251 eredetű astrocytoma modell rendszereken,
- felmérni az ErbB1 overexpressziójának és integrinokkal fennálló kölcsönhatásának hozzájárulását a sugárrezisztenciához erbB1 transzfektált astrocytoma vonalakon, és
- *in situ* kvantitálni az ErbB1 és integrin proteinek molekuláris kölcsönhatásait friss fagyasztott intraoperatív astrocytoma metszeteken, valamint korreláltatni az eredményeket a klinikai és az *in vitro* modell rendszerekben kapott adatokkal.

## **Anyagok és módszerek**

### *Antitestek*

Az ErbB1 ellenes 528, a  $\beta 1$  integrin ellenes TS2, a  $\beta 2$ -microglobulin ellenes L368, a HLA-A,B,C ellenes W6/32 és a CD44 ellenes Hermes3 monoklonális antitesteket az 528, TS2/16.2.1, L368, W6/32 és Hermes3 hibridóma sejtvonalak (ATCC) felülűszójából nyertük. Az ErbB2 molekula ellen a 2C4, 7C2 (adomány a Genentech Inc.-től) és trastuzumab (Hoffman-La Roche AG) monoklonális antitesteket és Fab' fragmentumaikat használtuk. Az ErbB3 és ErbB4 molekulákat a H3.90.6 (ErbB3 ellenes), valamint a 72.8 vagy 77.16 (ErbB4 ellenes) antitestekkel jelöltük (NeoMarkers, Lab Vision Corporation). Az integrin család jelöléséhez az anti-CD29/ $\beta 1$  integrin, anti-CD61/ $\beta 3$  integrin, anti-CD104/ $\beta 4$  integrin, anti-ITGB5/ $\beta 5$  integrin, anti-CD49a/ $\alpha 1$  integrin, anti-CD49b/ $\alpha 2$  integrin, anti-CD49d/ $\alpha 4$  integrin, anti-CD49f/ $\alpha 6$  integrin, anti-CD51/ $\alpha V$  integrin (Sigma, Dako-Cytomation, Research Diagnostics Inc.) monoklonális antitesteket használtuk. A konjugátlan elsődleges antitestek másodlagos indirekt jelöléséhez Cy3- és Cy5-konjugált kecske anti-egér antitesteket (GaMIg) és Fab' fragmentumaikat használtuk (Jackson ImmunoResearch). Az antitestek jelölését Cy3 és Cy5 (Amersham Biosciences Europe), Alexa Fluor<sup>®</sup> 546, Alexa Fluor<sup>®</sup> 555, Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 és XFITC (Molecular Probes) fluoroforokkal a gyártó specifikációi szerint végeztük. A festék - protein jelölési arányt spektrofotometriával határoztuk meg, amely Fab' fragmentumok esetén 1:1 volt, míg teljes IgG esetén a 2:1 - 3:1 tartományba esett.

### *Sejtek jelölése antitestekkel*

Áramlási citometriás mérésekhez a sejteket tripszinizáltuk,  $1 \times 10^6$  sejt / 50  $\mu$ l PBS (kiegészítve 0.1 % BSA-val) koncentrációban reszuszpendáltuk és telítési koncentrációban (10–20  $\mu$ g/ml) Alexa546/647-antitestekkel jelöltük jégen (4°C) 30 percig. Jelölés után a sejteket 3x mostuk PBS-ben és fixáltuk 500  $\mu$ l 1% formaldehid (PFA) tartalmú PBS-ben. Mikroszkópos mérésekhez a kitapadt sejteket 3x mostuk PBS-ben, telítési koncentrációban jelöltük X-FITC, Cy3, Alexa555 vagy Cy5 konjugált antitestekkel (egyedül vagy kombinációban) jégen 30 percig, majd 3x mostuk PBS-ben és fixáltuk 500  $\mu$ l 4% PFA tartalmú PBS-ben 20 percig. A lipid raftokat 8  $\mu$ g/ml Alexa488/Cy5-konjugált kolera toxin B alegységgel (CTX-B) jelöltük jégen 30 percig (Sigma). Keresztkötéshez a CTX-B jelölt lipid raftokat vagy a másodlagosan jelölt  $\beta 1$  integrineket 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Keresztkötés után a mintákat 15 percre jégre helyeztük a jelölési protokoll folytatása előtt.

### *Sejtkultúrák*

Az MKN-7 (Immuno-Biological Laboratories Cell Bank) és NCI-N87 (ATCC) gyomor adenokarcinóma, valamint az SK-BR-3 (ATCC) és JIMT-1 (Jorma Isola-tól, University of Tampere) emlőtumor sejtvonalakat szubkonfluitásig növesztettük.

Az U251 NCI anya sejtvonalat (National Cancer Institute - ezután U251) egy IV. grádusú astrocytomából (glioblastoma multiforme) alapították, amely kifejezett érzékenységet mutatott az ionizáló besugárzásra. MEM EBSS + 10% FCS + Nem Esszenciális Aminosav tápoldat mellett 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában szubkonfluitásig növesztettük. Korábban a humán 7-es kromoszóma egér eredetű A9 hibridjének mikrosejt fúziójával extra 7-es kromoszóma többletet hordozó U251 anyavonal klónokat hoztunk létre kollaborációs partnerünk laboratóriumában (Barrow Neurological Inst. / St. Joseph's Hospital, Phoenix).

### *Sejtes modell rendszerek*

#### 7-es kromoszóma transzferált U251 NCI klónok

Korábban már igazolták, hogy a 7-es kromoszóma többlet glioblastomában a sugárrezisztenciához társul, amelyet szintén alátámasztottak független megfigyelések az ErbB1 fokozott expressziója és a sugárrezisztencia kapcsolatáról, valamint a tény, hogy az erbB1 gén a 7-es kromoszómára lokalizálódik.

Az U251 klónok egy növekvő 7-es kromoszómatöbbletet hordozó és ezzel párhuzamosan fokozott sugárrezisztenciát mutató csoportját - c5, c9 és c55 - használtuk a 7-es kromoszóma többlettel összefüggésbe hozható molekuláris mechanizmusok feltérképezésére. A 7p régióval együtt proximális 7q többletet hordozó klónok fokozott sugárrezisztenciát mutattak, míg a kisebb disztális 7q többletet hordozók érzékenyebbek maradtak. A használt klónok sugárérzékenységét (anyavonal, c5, c9 és c55) korábban agar kolónia formáló teszt során (LD<sub>50</sub> értékek: 4, 4.7, 5 és 5.7 Gy) kollaborációs intézetünkben határozták meg (Barrow Neurological Institute / St. Joseph's Hospital and Medical Center, Phoenix).

Az extra 7-es kromoszóma többletet hordozó klónokkal szemben az U251 Hyg+ klónt használtuk kontrollként, amely nem hordozott kromoszóma többletet, de szintén expresszálta a hph gént, amely 0.4 mg/ml koncentrációban a klónok szelekciós kiválasztódását szabályzó hygromycin B elleni rezisztenciáért volt felelős. Így minden sejtvonalat azonos körülmények között növeszthettünk. A szubkonfluitás elérésekor a sejteket áramlási citometriás mérésekhez tripszinizálással gyűjtöttük be, míg mikroszkópos kísérletekhez 12 mm átmérőjű fedőlemezre vagy Lab-Tek II kamrába helyeztük őket (Nalge Nunc).

Stabilan erbB1 gén transzfektált U251 klónok

A fokozott ErbB1 expresszió hatásának pontosítása és a 7p kromoszómán kódolt egyéb gének szabályzó funkciójától történő elkülönítés céljából erbB1 gén transzfeccióval U251 klónokat hoztunk létre, amelyek különböző mértékben fejezték ki az ErbB1 receptort. Az erbB1 gént a geneticin rezisztenciát is hordozó pCDNA3 plazmiddal - megtisztelő adomány Yosef Yarden-től, Weizmann Inst. of Science - elektroporációval juttattuk a sejtekbe az Amaxa (Cologne) nucleofector eszköz segítségével (solution V és protocol T-20). Korábban, az expressziós vektor funkcionalitását az ErbB1 fehérje C-terminális végéhez fúzionált GFP jelzővel létrehozott eGFP-ErbB1 molekula CHO sejtekbe történő transzfecciójával igazoltuk, amelyek egyébként nem expresszálnak ErbB1 receptort.

A 0.4 mg/ml geneticin mellett szelektálódó erbB1 transzfektált U251 sejteket egy DiVa funkciójú FACSVantage SE áramlási citométerrel (Becton Dickinson) alacsony, közepes és magas ErbB1 expressziót mutató klónokra választottuk szét. A közepes expressziójú populáció a további növesztése során két, az alacsony és magas expressziójú klónokhoz hasonló alpopulációra vált szét. Továbbá, a szelektációs nyomás ellenére, a magas expressziójú populáció fokozatosan az alacsony expresszió irányába sodródott, ezért az áramlási citometriás elválasztást többször is meg kellett ismételni. Végül is egy alacsony ErbB1 (~150 ezer/sejt, U251 E1L) és egy magas ErbB1 (~1 millió/sejt, U251 E1H) expressziójú klónt különítettünk el, amely szelektációs nyomás mellett 3-4 passzázson keresztül megbízhatóan használható volt, mint stabil expressziós rendszer.

*Friss fagyasztott metszetek*

Az intraoperatív tumormintákat a Nemzeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével a DEOEC Idegsebészeti Klinika Agytumor és Szövetbankjában tároltuk -80 °C-on. A műtéti beavatkozás előtt minden beteg aláírt egy beleegyező nyilatkozatot. A daganatok kórszövettani besorolása a napi rutin klinikopathológiai munka alapján történt. A kórszövettani klasszifikációhoz használt minta közvetlen környezetéből származó mintákat folyékony N<sub>2</sub>-ben hűtött izopentánban (Sigma) gyorsfagyasztottuk. Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek) elegyben történt beágyazást követően -20 °C-on 15 µm vastag metszeteket vágunk egy cryostat-microtome rendszer segítségével (Shandon Cryotome, AS-0620E, Thermo Fisher Inc.). A szilánnal előkezelte tárgylemezekre helyezett metszeteket szárítottuk, 4% PFA-PBS oldatban 30 percig fixáltuk, 1% BSA-PBS oldatban 30 percig blokkoltuk és 20 µg/ml Cy3 konjugált anti-ErbB1 (528), illetve Cy5 konjugált anti-β1 integrin (TS2) antitesttel nedves kamrában, 4°C-on, egy éjszakán át jelöltük, majd 3x mostuk és glicerollal fedtük.

*A sugárérzékenység meghatározása*

A transzfektált klónok sugárérzékenységét 0, 2, 4, 6 és 8 Gray  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  irradációt követően mind hagyományos proliferációs teszttel EZ4U használatával (a mitokondriális aktivitás kolorimetrikus indikátora, Biomedica), mind pedig kolónia formáló teszttel határoztuk meg. A 2 Gy besugárzásnak kitett mintákat egy órával az irradáció előtt indított 20 nM wortmannin (Sigma-Aldrich) kezelésnek is alávetettük. A besugárzáshoz minden klón esetén hat darab, 200 sejtből álló replikátumot inkubáltunk indikátor-mentes DMEM médiumban egy sima aljzatú 96 lyukú lemezen. A sugárzás szóródásának minimalizása érdekében a lemezeket vízfürdőbe merítettük, és a besugárzó dózist a folyadékréteg vastagságának megfelelő abszorbanciára korrigáltuk. Hét nappal a besugárzás után a metilénkékkel (0.2%/70% etanol) festett kolóniákat egy Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments) mikroszkóp alatt számoltuk. Alternatívan, a klaszter kontúr meghatározás és kolónia számolás céljából a kolóniákat egy imaging citométerrel (CompuCyte Corp) 633 nm transzmissziós hullámhosszon is vizsgáltuk.

A túlélő hányadot a nem besugárzott sejtek betelepítő hatásfokára normalizáltuk. A túlélési görbék illesztését és ábrázolását a Lineáris Kvadratikus Modell szerint a Sigmaplot v10.0 (Systat Software) szoftverrel végeztük el.

*A sejtek aktiválása EGF-fel, heregulinnal és trastuzumabbal*

A fedőlemezen vagy szuszpenzióban levő sejteket 50 ng/mL EGF, 50 ng/mL  $\beta$ 1-heregin (HRG, R&D Systems) vagy 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trastuzumab (Herceptin®) kezelésnek vetettük alá 30 percig,  $\text{CO}_2$  inkubátorban, szérum-mentes médiumban, majd PBS-ben mostuk őket.

*Western blot analízis*

A PI-3K/Akt-PKB túlélési útvonal aktivitásának meghatározása céljából Western blot analíziseket végeztünk Akt és p-Akt proteineken. Mivel a jelátviteli útvonalak aktivációja nagymértékben függ a kezdeti egyensúlytól, ezért mind szérum-táplált és éheztetett sejteket is vizsgáltunk. Az éheztetést szérum-mentes médiumban (SFM) egy éjszakán át végeztük, majd a sejteket 50 ng/ml EGF-fel kezeltük 30 percig  $37^\circ\text{C}$ -on. A PBS-ben mosott sejt-pelleteket 5x SDS-sample pufferben szolubilizáltuk, szonikáltuk, 16.000x g mellett 5 percig centrifugáltuk és a felülúszókat ECL-vizualizált, peroxidáz-alapú immunoblottolás előtt standard SDS-PAGE-re (7% gél) helyeztük. Az Akt és pAkt fehérjéket specifikus antitestekkel (Upstate/Millipore) jelöltük, kontrollként a  $\beta$ -actin (AC40, Sigma-Aldrich) szolgált. Az Akt/pAkt specifikus sávokat kvantitáltuk, a háttérre korrigáltuk és  $\beta$ -actinra normalizáltuk.

*A sejtfelszíni receptor expresszió meghatározása áramlási citometriával*

A receptor expresszió kvantitálását DiVa funkciójú FACSVantage SE áramlási citométer (Becton Dickinson) FL-6 csatornáján keresztül (gerjesztés: 633 nm, detektálás: 650 nm long pass filter) lineáris módban végeztük. A begyűjtött 20.000 esemény hisztogramjának háttér korrigált átlagát QIFIKIT (DakoCytomation) használatával konvertáltuk antigén számra. A jelöletlen 528 vagy TS2 elsődleges antitesteket AlexaFluor-647 konjugált kecske anti-egér (H+L) másodlagos antitestekkel detektáltuk (Molecular Probes).

*Áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérések (FCET)*

A jelölt receptorok homo- és heteroasszociációjának meghatározására FCET méréseket végeztünk 488, 532 és 633 nm lézerekkel felszerelt DiVa funkciójú FACSVantage SE vagy 532 és 635 nm lézerekkel felszerelt FACSArray bioanalyzer (Becton Dickinson) áramlási citométereken. A FACSVantage SE berendezéssel végzett kísérletek során a FRET hatásfokot sejtenkénti autofluoreszcencia korrekcióval számítottuk.

Az élő sejteket előre és oldalra szórási csatornában való eloszlásuk alapján különítettük el az elhalt sejtektől és a törmeléktől. Az autofluoreszcenciát az FL1 csatornában (gerjesztés: 488 nm) 530/30 nm band pass filteren keresztül mértük. A donor intenzitásokat (gerjesztés: 532 nm) az FL4 csatornában 585/42 nm band pass filteren, míg az akceptor és szenzitizált akceptor intenzitásokat (gerjesztés: 633 nm) az FL6 és FL5 csatornában 650 nm long pass filteren keresztül detektáltuk. A donor (Alexa546) és akceptor (Alexa647) molekulák gerjesztését az 532 és 633 nm lézerekkel végeztük.

A FACSArray bioanalyzer-rel végzett mérések esetén a donor intenzitásokat (gerjesztés: 532 nm) a Yellow csatornában egy 585/42 nm band pass filteren, míg az akceptor és szenzitizált akceptor intenzitásokat (gerjesztés: 633 nm és 532 nm) a Red és Far-Red csatornában egy 661/16 nm band pass és egy 685 nm long pass filteren keresztül mértük. A listázási módban mentett adatokat FCS 3.0 fájl formátumban tároltuk. Az autofluoreszcenciára korrigált, sejtenkénti FRET hatásfok számítását a REFLEX szoftverrel végeztük. A közölt FRET hatásfokok 20.000 sejt alapján számított, megközelítőleg normál eloszlású, unimodális FRET hisztogramok átlagát és az átlag standard hibáját mutatják.

### *Konfokális mikroszkópia*

A sejtek vizualizálására egy Plan-Apochromat 63×/1.40 NA olaj immerziós objektívvel és egy UV/488/543/633 sugár elosztóval felszerelt Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (CLSM, Carl Zeiss AG) használtunk. Az X-FITC, Cy3 és Cy5 fluoroforokat 488, 543 és 633 nm-en (Ar-ion, He-Ne lézerek) gerjesztettük és 505-535 nm, 560–605 nm band pass és 650 nm long pass filtereken keresztül detektáltuk. Horizontális, 1-3 μm vastag, 4x átlagolt optikai metszeteket vettünk fel (512x512 pixel, 12 bit) a sejtmembrán alsó vagy felső sík rétegéről 2.51 μs pixel tartózkodási idővel és 3× nagyítással, "frame" módban (100 nm/pixel, 2x túlmintavételezés). Az abFRET mérések előtt meghatároztuk az indulási Cy5 fluoreszcencia kevesebb, mint 20%-ra csökkentéséhez szükséges optimális elhalványítási időt. Az ErbB1 és β1 integrin expresszió friss fagyasztott metszeteken történő méréséhez a képeket "tile" módban vettük fel, amely a nagy felbontás és konfokalitás megtartása mellett lehetővé tette nagy szöveti területek vizsgálatát. A csatornák közti átvilágítás kiküszöbölése érdekében a képeket "multi-track" módban vételeztük. A detektálási csatornák összehangoltságát FocalCheck fluoreszcens mintákkal (Molecular Probes) rendszeresen ellenőriztük.

### *Kereszt-korreláció számítása*

Két különböző fluoreszcens jelölés kolokalizációjának számítására a Pearson's formulát használtuk. Az alacsony intenzitású pixeleket kizártuk az analízisből. A kereszt-korrelációs koefficiens ( $C$ ) értéke +1 és -1 között változhat; az 1, 0 és -1 közeli értékek rendre magas és alacsony szintű kolokalizációt, illetve antikorrelációt jeleznek. A  $C$  értékeket Zeiss LSM v3.2 vagy LabView-ban írt (National Instruments) egyedi készítésű szoftverrel számítottuk.

### *Donor fotoelhalványításos módszer (dbFRET)*

Az 1989-ben Jovin és Arndt-Jovin által kifejlesztett dbFRET módszer során az energia transzfer hatásfokát a donor molekula akceptor jelenlétében, illetve hiányában változó fotoelhalványodási kinetikája alapján számítjuk. Ezt a kinetikát a donor kvantumhatásfokával inverz függőséget mutató időállandóval ( $\tau$ ) jellemezhetjük.

A dbFRET kísérletekben a minták fotoelhalványítását a 488 nm hullámhosszú Ar-ion lézer nagy teljesítményű (20-40%) használatával, 40-50 felvétel idősorozatként történő készítésével végeztük. A képeken szükség esetén medián vagy low pass szűrőt használtunk (3x3 kernel, LSM v3.2 szoftver), és küszöb-kapuzást követően a dbFRET szoftverrel illesztettük, ami végülis a pixelenkénti időállandókat tartalmazó képeket eredményezett.

*Akceptor fotoelhalványításos módszer (abFRET)*

Kitapadt sejtek és szövetek esetén a FRET méréséhez a mikroszkópra kifejlesztett technikák közül az abFRET módszer egy gyors és egyszerű eljárás, amely az akceptor fluorofor (Cy5) fotoelhalványítása során bekövetkező irreverzibilis károsításán alapszik és "de-quench" révén a donor fluoreszcencia (Alexa555) felerősödéséhez vezet. A pixelenkénti FRET hatásfok ( $E$ ) ezt követően a donor fluoreszcencia akceptor fotoelhalványítás előtti és utáni értékének változásából számítható, az eltolódásra, a háttérre, a donor fotoelhalványodásra és az akceptor fluoreszcencia donor csatornába történő átvilágítására történő korrekció után. Az inkomplett akceptor fotoelhalványodásra nem korrigáltunk, mivel a 80%-nál kevesebb akceptor fluoreszcencia csökkenést mutató mintákat kizártuk az analízisből.

A mérési protokollt egy LSM 510 CLSM (Carl Zeiss AG) berendezésre adaptáltuk. A kitapadt sejteket 3x mostuk, megfelelő donor és/vagy akceptor konjugált antitestekkel jégen 30 percig jelöltük, majd ismét 3x mostuk PBS-ben és fixáltuk 500  $\mu$ l 4% PFA tartalmú PBS-ben 20 percig. A fedőlemezeket előtisztított tárgylemezekre helyeztük és glicerinnel fedtük. A felvételeket a fentebb leírtak szerint vételeztük. A kép szekvenciák elemzéséhez és az átlagos FRET hatásfok számításához egyedileg készített SCIL Image C algoritmust (TNO, Institute of Applied Physics) vagy szintén egyedileg írt ImageJ plugint (AccPbFRET) használtunk. A kimeneti eredményeket standard citometriás adat formátumban (ICS 1.0) tároltuk.

*Statisztikai analízis*

Az adatok tárolását és analízisét a SigmaStat v3.5.0.54 (Systat) szoftverrel végeztük. A II. és IV. grádusú astrocytoma csoportokat Student's t-teszttel vagy normalitás hiánya esetén (Kolmogorov-Smirnov Lilliefors' korrekció) Mann-Whitney rangösszeg teszttel elemeztük. Kettőnél több, normál eloszlást mutató csoport összehasonlítása esetén ANOVA analízist és *post-hoc* Tukey's tesztet alkalmaztunk. Az ErbB1,  $\beta$ 1 integrin expresszió és ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció túlélésre és relapszus-mentes időre kifejtett prediktív erejét többszörös lépcsőzetes előrehaladó lineáris regresszióval, míg a tumor grádusára vonatkozó predikciót bináris logisztikus regresszióval becsültük meg. A II. és IV. grádusú, illetve a csoportok ErbB1,  $\beta$ 1 integrin expresszió és ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció átlaga alatti és feletti alcsoportokra való osztásával képzett tumorcsoportok teljes és relapszus-mentes túlélését Kaplan-Meier analízissel elemeztük. A csak részleges reszekción átesett, valamint a tanulmány kezdete után besorolt betegeket a túlélési idejüknel cenzoráltuk az analízisből. A statisztikai összehasonlítást log-rank teszttel és *post-hoc* Holm-Sidak módszerrel végeztük.

## Eredmények

### Az ErbB és $\beta 1$ integrin molekulák kölcsönhatása emlő és gyomor tumor sejtvonalakon

#### *Az alacsonyabb ErbB2 expresszió magasabb $\beta 1$ integrin szintekkel társul*

Először az ErbB1-4 proteinek, valamint a  $\beta 1$ -,  $\beta 3$ - és  $\alpha 6$  integrinek expresszióját határoztuk meg trastuzumab rezisztens (JIMT-1, MKN-7) és érzékeny (SK-BR-3, N87) sejtvonalakon áramlási citometriával. A trastuzumab rezisztens vonalak alacsonyabb ErbB2 (112.000 és 500.000/sejt) és magasabb  $\beta 1$  integrin (2.460.000 és 566.000/sejt) expressziós szintet mutattak (rendre JIMT-1 és MKN-7). A trastuzumab rezisztens JIMT-1 vonal extrém magas szinten expresszálta a  $\beta 1$  integrint (2.460.000/sejt), míg a trastuzumab érzékeny ellenpárja, az SK-BR-3 mutatta a legalacsonyabb expressziót (81.000/sejt). A többi ErbB és integrin molekula expressziós mintázatában nem mutatkozott karakterisztikus eltérés.

#### *Az ErbB2, $\beta 1$ integrin és lipid raftok kolokalizációja és az alkalmazott kezelések hatásai*

Az ErbB2 és  $\beta 1$  integrin molekulák jelentős kolokalizációját mutattuk ki minden sejtvonalon ( $0.61 \pm 0.08$  -  $0.76 \pm 0.02$ ), ami független volt a trastuzumab rezisztenciától. Továbbá, mind az ErbB2 és  $\beta 1$  integrin a lipid raftokban lokalizálódott. A korábban már dokumentált, nem átfedő transferrin-ErbB2 receptor párt választottuk negatív kontrollként, amely  $0.13 \pm 0.02$  *C* értéket adott. Két nem-kompetáló ErbB2 ellenes monoklonális antitesttel (Cy5-2C4, Cy3-trastuzumab) jelölt minták szolgáltak pozitív kontrollként (*C* érték  $0.75 \pm 0.06$ ).

A trastuzumab, EGF és heregulin kezelések egyike sem befolyásolta szignifikánsan az ErbB2- $\beta 1$  integrin kolokalizációt; a trastuzumabbal kezelt emlő tumor sejtek azonban szignifikánsan alacsonyabb  $\beta 1$  integrin-lipid raft és ErbB2-lipid raft kolokalizációt mutattak.

#### *Az ErbB2, $\beta 1$ integrin vagy lipid raftok keresztkötése felbontja a másik két molekulával fennálló kölcsönös kolokalizációt függetlenül a citoskeletális rögzítettségtől*

A lipid raftok CTX-B indukálta keresztkötése szignifikánsan csökkentette kolokalizációjukat mind ErbB2-vel, mind  $\beta 1$  integrinnel az összes sejtvonalon (*C* értékek: 0.60-0.75, 0.10-0.20 és 0.15-0.30 ErbB2- $\beta 1$  integrin,  $\beta 1$  integrin-lipid raft és ErbB2-lipid raft párok esetén).

A  $\beta 1$  integrin keresztkötése minden vizsgált partnerével csökkentette a kolokalizációs értékeket (*C* értékek: 0.10-0.20 mind a  $\beta 1$  integrin-ErbB2, mind a  $\beta 1$  integrin-lipid raft

párokra) az összes sejtvonalon, ami a  $\beta 1$  integrin ErbB2-vel és lipid raftokkal alkotott komplexéből történő felszabadulására utal. A cytochalasin D kezelés során nem változtak szignifikánsan a kolokalizációs értékek, amely arra utal, hogy az aktin citoskeleton nem befolyásolja az ErbB2, a  $\beta 1$  integrin és a lipid raftok interakcióit.

### *Az ErbB2 - $\beta 1$ integrin kölcsönhatás független a $\beta 1$ integrin expressziós szintjétől*

A kolokalizációs kísérletek megerősítették, hogy az ErbB2 és a  $\beta 1$  integrin ugyanazon membrán doménekre lokalizálódik, a molekuláris kölcsönhatásaik vizsgálatára azonban FRET mérések szükségesek. Az ErbB2 és  $\beta 1$  integrin vizsgálata minden esetben a magasabb expressziót mutató partner akzeptorként való megválasztásával történt. A JIMT-1 ( $9.7 \pm 1.8\%$ ) és N87 ( $7.1 \pm 1.3\%$ ) sejteken az ErbB2 és  $\beta 1$  integrin szorosabb interakcióját mutattuk ki, míg SK-BR-3 ( $3.3 \pm 2.0\%$ ) és MKN-7 ( $5.8 \pm 2.2\%$ ) sejteken az asszociáció foka alacsonyabb volt.

A trastuzumab érzékeny SK-BR-3 ( $16.1 \pm 1.2\%$ ) és N87 ( $11.5 \pm 0.1\%$ ) vonalakon az ErbB2 nagyfokú homoasszociációját tapasztaltuk, míg a rezisztens vonalak 5% alatti FRET hatásfokot mutattak. Az ErbB1 homo- és ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció az érzékeny, míg az ErbB1- $\beta 1$  integrin heteroasszociáció mind az érzékeny és rezisztens emlőtumor vonalon is erősnek bizonyult. Az EGF indukálta fokozott ErbB1 heteroasszociáción túl a trastuzumab és HRG kezelésre egyik sejtvonalon sem detektáltunk szignifikáns változást a FRET értékekben.

### *Az ErbB2 és $\beta 1$ integrin közötti molekuláris interakció nem befolyásolja a trastuzumab mediált ErbB2 tirozin foszforilációt*

Ismerve az integrineknek az ErbB vezérelt jelátviteli folyamatokra kifejtett potenciális modulátor szerepét, lehetségesnek tűnt, hogy a trastuzumab rezisztens sejtvonalak magasabb  $\beta 1$  integrin expressziója nagyobb mértékben befolyásolja a trastuzumab mediált ErbB2 tirozin foszforilációt. Vizsgálataink során szérum éheztetett SK-BR-3 és JIMT-1 sejtek trastuzumab stimulációra adott reakcióját mértük a  $\beta 1$  integrinek kezelést megelőző keresztkötésével vagy anélkül. A korábbi eredményekkel párhuzamban az ErbB2 tirozin foszforiláció alacsonyabb volt a nem-stimulált JIMT-1 vonalon, mint az SK-BR-3 sejtekben.

A trastuzumab az ErbB2 tirozin foszforilációját indukálta mind trastuzumab érzékeny és rezisztens sejteken, míg a  $\beta 1$  integrin keresztkötése nem befolyásolta azt a továbbiakban a nagyfokú  $\beta 1$  integrin expressziót mutató trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejtvonalon sem. Mindezek arra utalnak, hogy a JIMT-1 sejtek magas sejtfelszíni  $\beta 1$  integrin expressziója ellenére a trastuzumab indukálta első szignalizációs lépések e tekintetben nem érintettek.

## **A $\beta 1$ integrin dinamikusan modulálja az ErbB molekulák asszociációit - az újonnan kifejlesztett kétoldali FRET módszer alkalmazása**

*A  $\beta 1$  integrin többlet inverzen korrelál az ErbB2 szinttel trastuzumab rezisztens vonalakon*

Először megismételtük áramlási citometriás méréseinket az ErbB1, ErbB2 és  $\beta 1$  integrin kifejeződés vonatkozásában kiterjesztve azt a CD44 és MHC-I expresszió irányában. A trastuzumab rezisztens sejtek alacsonyabb ErbB2 és magasabb  $\beta 1$  integrin (lásd korábban), illetve CD44 (1.1-2.3 millió/sejt a rezisztens és 100-200 ezer/sejt az érzékeny vonalakon) expressziót mutattak. Az ErbB1 és MHC-I molekulák expressziója nem mutatott karakterisztikus különbséget a vizsgált trastuzumab rezisztens és érzékeny vonalak között.

*Az ErbB2 interakciók a  $\beta 1$  integrinnel alkotott heteroasszociációk irányába tolódnak el*

Miután eltérést detektáltunk az ErbB2,  $\beta 1$  integrin és CD44 expressziókban, a molekuláris asszociációk mérését tűztük ki célul FCET módszerrel. Az ErbB2 homoasszociáció mértéke korrelált az expressziós szintjével, amely az ErbB2-t magasán expresszáló trastuzumab érzékeny vonalak fokozott ErbB2 homoasszociációs tendenciájára utalt. A heteroasszociációk vizsgálata a magasabb expressziót mutató partner akzeptorként való megválasztásával történt. A rezisztens JIMT-1 vonalon jelentős fokú ErbB2- $\beta 1$  integrin heteroasszociációt detektáltunk (13.1 $\pm$ 1.1%), míg az MKN-7 és N87 sejtek közepes fokú (9.1 $\pm$ 1.2% és 7.1 $\pm$ 1.3%), az SKBR-3 sejtek pedig alacsony (<5%) heteroasszociációt mutattak. A CD44 heteroasszociációja ErbB2-vel és  $\beta 1$  integrinnel magasnak adódott a JIMT-1 vonalon (19.9 $\pm$ 1.5% és 10.5 $\pm$ 1.0%), de alacsonynak a hasonlóan rezisztens MKN-7 sejteken (4.2 $\pm$ 0.7% és 3.7 $\pm$ 0.5%).

### *Kétoldali FRET modell rendszer (tsFRET)*

A tsFRET módszer gyakorlati bizonyítására egy CLSM-re kifejlesztett tripla jelölésű modell rendszert terveztünk, amelyben az első fluorofor (XFITC) egy donor festék (D1), a második (Cy3 vagy Alexa555) akzeptorként funkcionál (A1) az elsőhöz képest és donorként (D2) a harmadik fluoroforhoz képest (Cy5), amely akzeptorként (A2) viselkedik e tekintetben.

A fenti rendszerben az energia transzfer hatásfok szekvenciálisan mérhető az abFRET módszer (D2 $\equiv$ A1 és A2 között) és az ezt követő dbFRET módszer (D1 és A1 $\equiv$ D2 között) alkalmazásával. Az eljárás használhatóságának demonstrálására az ErbB2 molekula három nem-kompetáló antitesttel történő jelölését használtuk - XFITC-7C2 (D1), Cy3 vagy Alexa555-konjugált 2C4 (A1 $\equiv$ D2) és Cy5-4D5 (A2). A pixelenkénti dbFRET és abFRET

hatásfokok 2D mátrixát és az azonos pixelek értékeiből képzett kontúr térképet 5-10% FRET tartományokban számítottuk és ábrázoltuk. A két FRET hatásfok kapcsolatát a meghatározott dbFRET tartományokra átlagolt abFRET értékek illesztésével nyert trendvonal bevezetésével jellemeztük. A modell rendszerünkben a kontúr térkép és trendvonal (meredekség = 0.003) alapján a FRET értékek nem mutattak korrelációt, amely megegyezett a várakozásokkal, mivel ez esetben mind a dbFRET és abFRET értékek intramolekuláris távolságokat jeleztek.

### *A tsFRET módszer alkalmazása: az ErbB2 homoasszociáció felbomlik $\beta 1$ integrin hatására*

Az SK-BR-3 és N87 vonalakon meghatároztuk az ErbB2- $\beta 1$  integrin heteroasszociáció (dbFRET) hatását az ErbB2 homoasszociációra (abFRET). A JIMT-1 és az MKN-7 vonalakat nem vizsgáltuk e tekintetben, mert az ErbB2 homoasszociáció mértéke alacsony volt ezen sejteken FCET és abFRET mérésekkel is. N87 sejtek esetén a kontúr térképen két különböző csúcs ábrázolódtott a 13% (abFRET) – 20% (dbFRET) és 7% (abFRET) – 30% (dbFRET) helyeken, valamint a trendvonal meredeksége ( $m$ ) -0.042 volt, amely az asszociációk anti-korrelációjára utalt. Hasonló anti-korrelációt észleltünk SK-BR-3 sejteken ( $m = -0.080$ ); habár a kontúr térkép csak egyetlen csúcsot mutatott a 12% (abFRET) – 26% (dbFRET) helyen.

Az ErbB2- $\beta 1$  integrin és  $\beta 1$  integrin-CD44 heteroasszociációk analízise során közepes fokú pozitív korrelációt detektáltunk az MKN-7 sejtek kontúr térképe alapján (két diszkrét csúcs a 10% (abFRET) – 22% (dbFRET) és 20% (abFRET) – 32% (dbFRET) helyeken,  $m = 0.077$ ). Ezzel szemben, a JIMT-1 sejtek kontúr térképén csak egyetlen csúcs mutatkozott a 12% (abFRET) – 21% (dbFRET) pozícióban és  $m = -0.002$  volt, ami nem jelzett kapcsolatot az asszociációk között. Az ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció és ErbB2 homoasszociáció, illetve az ErbB1,  $\beta 1$  integrin és MHC-I interakcióinak vizsgálata során sem a kontúr térképek, sem a trendvonalak nem utaltak egyértelmű összefüggésre az asszociációk között.

Az áramlási citometriás és mikroszkópos adatok összehasonlítása során az FCET értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a kapcsolódó mikroszkópos FRET értékek. A mikroszkópos FRET módszer esetleges túlbecslésének kizárására összehasonlítottuk az ErbB2- $\beta 1$  integrin heteroasszociációra kapott dbFRET értékeket tripszinizált, citocentrifugált SK-BR-3 és MKN-7 sejteken ( $1.1\pm 0.3\%$ ,  $3.8\pm 0.5\%$ ) és kitapadt, nem tripszinizált sejteken ( $26.3\pm 1.3\%$ ,  $15.2\pm 2.4\%$ ). Az eredmények alátámasztották, hogy a FRET hatásfok csökkenését FCET mérések során nem maga a módszer, hanem a tripszinizálás okozza. Továbbá, a "z" tengely mentén felvett optikai metszetek sorozatán végzett méréseink alapján bebizonyosodott, hogy a  $\beta 1$  integrin és a CD44 molekula inhomogéne oszlik el a sejt felszínen és fokozottan expresszálódik, illetve asszociálódik a sejt kitapadásának síkjában.

**Az ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin molekuláris interakciói megbízhatóan jelzik a klinikai kimenetelt és korrelálnak az astrocytomák Akt-mediált *in vitro* sugárrezisztenciájával**

*A magasabb ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin expresszió korrelál a fokozott sugárérzékenységgel*

Elsőként feltérképeztük a Hyg+, c5, c9 és c55 klónok  $\alpha$ V,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 és  $\beta$ 5 integrin expresszióját. A növekvő extra chr7 többlettel és sugárrezisztenciával (LD50: 4.0, 4.7, 5.0 és 5.7 Gy) párhuzamosan, a klónok nemcsak fokozott ErbB1 expressziót (65, 77, 83, 270 ezer), hanem szintén fokozott  $\beta$ 1 integrin expressziót mutattak (360, 400, 420 és 540 ezer).

*A fokozott ErbB1 expresszió önmagában is magasabb  $\beta$ 1 integrin szinteket indukál*

Kezdetben mind az E1L és E1H klón fokozott ErbB1 (230 és 940 ezer) és párhuzamosan fokozott  $\beta$ 1 integrin (360 és 380 ezer) expressziót mutatott az U251 anyavonallal szemben (ErbB1: 70 ezer,  $\beta$ 1 integrin: 240 ezer). Változatlan ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin expresszió mellett azonban, az E1H/H klón aránya fokozatosan 5%-ra csökkent a passzálások során. Érdekes módon, az E1H/H klón  $\beta$ 1 integrin expressziója nem mutatott további növekedést az E1L klónnal szemben az ErbB1 expresszió extrém fokú növekedése ellenére.

*Az ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin többlet hozzájárul a sejtek besugárzás utáni túléléséhez, míg a további ErbB1 növekedés a kolónia formáló képességet segíti*

A transzfektált klónok besugárzás utáni túlélő hányada a fokozódó ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin expresszióval párhuzamosan növekedett, azonban az E1H klón további ErbB1 többlete nem okozott további növekedést a túlélési rátában. Mind az  $\alpha$  és  $\beta$  paraméter különbözött az anyavonal és a klónok között, de a klónok egymás között nem mutattak különbséget ( $\alpha$ : 0.33, 0.10, 0.10;  $\beta$ : 0.09, 0.06, 0.06 az U251, E1L, E1H vonalakon). Mindazonáltal, az E1H klón extrém ErbB1 többlete fokozta a kolónia formáló képességét az E1L vonallal szemben is.

*A fokozott  $\beta$ 1 integrin expresszió döntő jelentőségű a növekvő Akt-függő sugárrezisztenciában, ami a PI-3K gátlásával visszafordítható*

Western blot vizsgálataink során a pAkt szint mind E1L és E1H klón esetén szignifikáns, 85%-os növekedést mutatott. EGF kezelésre a pAkt/Akt arány szintén növekedett mindkét klón esetén ( $1.6 \pm 0.2$ ,  $1.8 \pm 0.2$ ) az anyavonallal szemben ( $1.1 \pm 0.1$ ). A PI-3K wortmannin gátlásával az E1L megnövekedett sugárrezisztenciája visszafordítható volt; PI-3K inhibitor jelenlétében történt besugárzás mellett a kolónia növekedés 85%-ról 30%-ra esett vissza.

### *FCET mérések: az egyensúly az ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció irányába tolódik el*

A Hyg+, c5, c9, c55 klónok csökkenő ErbB1 homoasszociációi (11 $\pm$ 1%, 6 $\pm$ 1%, 4 $\pm$ 1%, 1 $\pm$ 0.5%) és növekvő ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociációi (6 $\pm$ 1%, 7 $\pm$ 1%, 8 $\pm$ 1%, 9 $\pm$ 2%) alapján, úgymint az U251 anyavonal, E1L, E1H/L és E1H/H hasonló értékei alapján (13 $\pm$ 1%, 10 $\pm$ 0.1%, 10 $\pm$ 0.2%, 7 $\pm$ 0.5% és 5 $\pm$ 1%, 7 $\pm$ 0.5%, 7 $\pm$ 0.5%, 10 $\pm$ 1%) antikorrrelációt detektáltunk. A FRET hatásfokot a donor-akceptor jelölés megfordításával az ellenkező ( $\beta$ 1 integrin-ErbB1) irányban is megmértük és hasonló tendenciát tapasztaltunk (2%, 3%, 4%, 18%).

### *tsFRET mérések: a $\beta$ 1 integrin maga mellé toborozza az ErbB1-t annak homoklasztereiből*

Mind az E1H/L és E1H/H esetén antikorrrelációt detektáltunk az ErbB1 homoasszociáció és az ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció között. Szintén figyelemreméltó a kontúr térképek és trendvonal meredekség változása ( $m$ : -0.3373, 0.090 az E1H/L, E1H/H klónokban) alapján mutatkozó erősebb hetero- és gyengébb homoasszociációs tendencia az E1H/H klón esetén.

### *Az ErbB1 és $\beta$ 1 integrin expresszió és interakció fokozódik IV. grádusú astrocytomában*

Tíz II. grádusú (18 - 59 éves, átlag 37.8 év, 5 férfi és 5 nő) és tíz IV. grádusú (42 - 73 éves, átlag 61.4 év, 3 férfi és 7 nő) astrocytoma beteget vontunk be a tanulmányba. Mind ErbB1, mind  $\beta$ 1 integrin tekintetében magasabb háttér korrigált átlagos fluoreszcencia intenzitást mértünk IV. grádusú tumor metszeteken, mint II. grádusúakon. Összességében, IV. grádusú tumorokon *in situ* végzett abFRET magasabb ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociációt igazolt, mint II. grádusúakon. A két csoport elválását bináris logisztikus regresszióval bizonyítottuk.

### *Az ErbB1- $\beta$ 1 integrin asszociáció önmagában is a terápia-kimenetel potenciális prediktora*

Az ErbB1- $\beta$ 1 integrin asszociáció II. és IV. grádusú tumorok közötti szignifikáns eltérése mellett ( $p < 0.001$ ), a grádus becslése szempontjából is meghatározó faktornak bizonyult lépcsőzetes bináris logisztikus regresszió során (OR=8716). Többszörös lépcsőzetes lineáris regresszió során a FRET hatásfok a relapszus prediktoraként került előtérbe mind II. és IV. grádusú tumorok között, mind pedig csak a IV. grádusú csoportban ( $p = 0.094$ ,  $0.085$ ). A II. és IV. grádusú, illetve az ErbB1,  $\beta$ 1 integrin expresszió és ErbB1- $\beta$ 1 integrin asszociáció átlaga alatti és feletti csoportokra való osztással képzett alcsoportok Kaplan-Meier analízise során a teljes és progresszió-mentes túlélés is ugyanolyan jól elvált a kórszövettani besorolás és az ErbB1- $\beta$ 1 integrin asszociáció mértéke alapján ( $p < 0.001$ ), míg az ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin szintek alapján kisebb, de még mindig szignifikáns különbségek adódtak ( $p = 0.014$ ,  $p = 0.004$ ).

## Összefoglalás

Kutatásunk az ErbB receptorok és integrinek molekuláris interakcióinak vizsgálatára irányult, hogy felfedjük kölcsönhatásaik potenciális szerepét az emlőtumorok trastuzumab rezisztenciájának és az astrocytomák sugárrezisztenciájának hátterében. A szomszédos membrán fehérjék kölcsönös interakcióinak vizsgálatára egy új módszert - kétoldali FRET - fejlesztettünk ki, amely alkalmas három tetszőlegesen megválasztott molekula által képzett két különböző molekuláris interakció korrelációjának mérésére. Egyedi klinikai tumorokban fennálló és esetenként különböző molekuláris kölcsönhatások pontos feltérképezése céljából pedig *in situ* friss fagyasztott metszetekre adaptáltuk az abFRET módszert.

Eredményeink alapján felmerül, hogy emlőtumorokban az ErbB2 homoasszociációját *in vitro* dinamikusan modulálja az ErbB2- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció, azonban a trastuzumab rezisztencia irányában egyértelmű összefüggés nem alapozható tanulmányunkra. Mindazonáltal feltételezhető, hogy a fokozott  $\beta$ 1 integrin expresszió befolyással van az emlőtumor sejtek jelátvitelére és mintegy alternatív utat biztosít a MAPK és PI-3K/Akt útvonalak aktiválódása, illetve a metasztatizáló képesség potenciális kifejlődése számára.

Miután előzetes vizsgálataink bizonyították az ErbB2 receptor és a  $\beta$ 1 integrin molekula dinamikus kölcsönhatását és astrocytoma sejtvonalakon végzett szűrővizsgálataink a már jól ismert emelkedett ErbB1 expresszió mellett a  $\beta$ 1 integrin fokozott kifejeződését igazolták, célul tűztük ki az ErbB1- $\beta$ 1 integrin interakció vizsgálatát a gliomagenezis hátterében.

Két sejtes modell rendszert állítottunk fel, amelyek az alacsony és magas grádusú astrocytomákhoz hasonló ErbB1 és  $\beta$ 1 integrin expressziós mintázattal rendelkeztek. Igazoltuk, hogy a fokozott ErbB1 expresszió a  $\beta$ 1 integrin expresszió növekedésével és a sugárérzékenység csökkenésével társult. Ezzel párhuzamosan az ErbB1 homoasszociáció csökkenését az ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció fokozódása követte. A sugárrezisztenciát magyarázhatta az ezzel együtt fokozódó bazális Akt foszforiláció és PI-3K/Akt szignalizáció. EGF kezelés hatására a PI-3K útvonalon bekövetkező augmentáció a PI-3K gátlásával visszafordítható volt, amely egyúttal a fokozott sugárrezisztencia elvesztésével is együtt járt. Friss fagyasztott II. és IV. grádusú astrocytoma mintákon szintén erős ErbB1- $\beta$ 1 integrin interakciót mutattunk ki, amely a túlélés és a relapszus hatékony prediktorának bizonyult.

Az ErbB1- $\beta$ 1 integrin heteroasszociáció *in situ* vizsgálatában az abFRET módszer diagnosztikus jelentőségű módszernek bizonyult a sejtfunkciós változások viszonylatában, és felveti a lehetőségét hasonló tanulmányok elvégzésének, amely hozzájárulhat a betegek prognosztikai csoportosításához és egyedi terápiás megközelítések alkalmazásához.

### Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Szöllősi János Professor Úrnak*, aki mindvégig, minden nehézség közepette türelmesen támogatott az évek során és lehetővé tette, hogy sikeresen befejezhessem munkámat és elkészíthessem téziseimet. Széleskörű ismeretei alapján adott céltudatos iránymutatásaival folyamatosan segítette és nyomonkövette szakmai fejlődésem, a munka során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldása érdekében bármikor rendelkezésre állt segítő tanácsaival. Mindezentúl, kiemelkedő emberi tulajdonságai a tudományos előremenetelem mellett személyes fejlődésemre is nagy hatással voltak.

Külön köszönettel tartozom társtémavezetőmnek, *Klekner Álmos Tanár Úrnak*, akinek elméleti megfontolásai, célratörő észrevételei, a betegekkel szemben mutatott empatikus bánásmódja, precizitása mély hatást gyakorolt tudományos és klinikai munkásságomra. Mindörökké hálával emlékezem *Csécsei György Professor Úrra*, aki kezdeti lépéseimet irányította, de a tézisek elkészültét sajnos már nem érthette meg.

Rendkívüli hálámat szeretném kifejezni *Vereb György Professor Úrnak*, akinek az útmutatásai végig vezettek az utamon és segítsége, figyelme a munkám minden egyes területére kiterjedt. A Tőle tanult tudományos alaposság, a részletekre alapozó, de ugyanakkor átfogó, logikus érvelés, az önmagunkkal szemben való szigorú szakmai elvárás, elhivatottság és kitartás döntően meghatározták a gondolkodásmódom, valamint tudományos fejlődésem, és a jövőben mindig példaként fognak előttem állni.

Kitüntetett köszönettel tartozom *Nagy Kálmán Professor Úrnak*, aki azontúl, hogy a klinikai munkám mellett mindvégig biztosította az időt a megfelelő felkészüléshez és a nap bármely részében rendelkezésre állt a felmerülő nehézségek megoldása érdekében, önzetlen támogatásával, valamint meghatározó szakmai észrevételeivel nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a munkám befejezéséhez. Szakmai alapossága, a betegségek leküzdése és a betegek gyógyulása érdekében mutatott fáradhatatlan tenniakarása, az összefüggéseket átlátó rendkívüli gondolkodásmódja mélyen áthatotta fejlődésemet és olyan példaként lebeg előttem, mely bármilyen nehézség közepette erőt ad a továbbiakban szükséges teendők ellátásához.

Segítőkétségükért köszönet illeti munkacsoportunk minden tagját: *Fazekas Zsolt, Sebestyén Zsolt, Nagy Péter, Lajtos Tamás, Maria-Magdalena Mocanu, Friedländer Elza, Zsebik Barbara, Horváth Gábor, Fábíán Ákos, Barok Márk, Ujlaky-Nagy László és Dóczy-Bodnár Andrea, Szentesi Gergely*. Külön köszönöm *Kern Mária Tanár Nő* gyakorlati tanácsait és segítségét, valamint *Óri Gabriella, Terdik Tünde, Toldi Hajnalka* laboratóriumi segédletét és a *DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, az Idegsebészeti Klinika, illetve a Borsod-A.-Z. Megyei Kórház Gyermekegészségügyi Központ* minden munkatársának segítőkétségét.

Leírhatatlanul hálás vagyok *feleségemnek*, aki a hosszú évek alatt szeretetével mindvégig támogatott, kitartóan bátorított, és minden nehézség és "időalagút" közepette türelmesen segített a céljaim megvalósítása érdekében.

Hálás vagyok *szüleimnek és családtagjaimnak* segítőkétségükért, valamint a lehetőségért, hogy elinduljak az utamon és valóra válthassam terveimet.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt és a Baross Gábor Program (REG-EA-09-1-2009-0010) támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



ÚJ SZÉCHENYI TERV



Iktatószám: DEENKÉTK/104/2013.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Petrás Miklós

Neptun kód: ELUGCO

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Petrás, M.**, Lajtos, T., Friedländer, E., Klekner, Á., Pintye, É., Feuerstein, B.G., Szöllősi, J., jr. Vereb, G.: Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin-beta1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt mediated in vitro radioresistance. *Neuro-Oncology*. "accepted by publisher", 2013.  
IF:5.723 (2011)
2. **Petrás, M.**, Hutóczki, G., Varga, I., jr. Vereb, G., Szöllősi, J., Bognár, L., Ruzsithi, P., Kenyeres, A., Tóth, J., Hanzély, Z., Scholtz, B., Klekner, Á.: Különböző eredetű malignus agydaganatok invazivitásának panelszerű vizsgálata. *Magyar Onkológia*. 53 (3), 253-258, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MOnkol.53.2009.3.3>
3. Fazekas, Z., **Petrás, M.**, Fábíán, Á., Pályi-Krekk, Z., Nagy, P., Damjanovich, S., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: Two-sided fluorescence resonance energy transfer for assessing molecular interactions of up to three distinct species in confocal microscopy. *Cytom. Part A*. 73 (3), 209-219, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20489>  
IF:3.259
4. **Petrás, M.**, Lajtos, T., Pintye, É., Feuerstein, B.G., Szöllősi, J., jr. Vereb, G.: Significance of Epidermal Growth Factor Receptor in the Radiation Resistance of Glioblastoma Tumors. In: Radiation Damage In Biomolecular Systems : Proceedings of the 5th International Conference (RADAM 2008). Ed.: by Károly Tőkési, Béla Sulik, American Institute of Physics, Melville (New York), 204-217, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3058983>





5. Mocanu, M., Fazekas, Z., **Petrás, M.**, Nagy, P., Sebestyén, Z., Isola, J., Timár, J., Park, J.W., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines.  
*Cancer Lett.* 227 (2), 201-212, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.028>  
IF:3.049

### További Közlemények

6. Varga, I., Hutóczki, G., **Petrás, M.**, Scholtz, B., Miko, E., Kenyeres, A., Tóth, J., Zahuczky, G., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Expression of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Human Glioblastoma Versus Intracerebral Lung Adenocarcinoma Metastasis.  
*Cent. Eur. Neurosurg.* 71 (04), 173-180, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249698>  
IF:0.472
7. Horváth, G., **Petrás, M.**, Szentesi, G., Fábíán, Á., Park, J.W., jr. Vereb, G., Szöllősi, J.: Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements.  
*Cytometry A.* 65A (2), 148-157, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20142>  
IF:2.115

**Összesített impakt faktor: 14.618**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 12.031**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.03.14



**Idézhető absztraktok:**

1. *Magda Tufeanu, Zsolt Fazekas, Miklós Petrás, Jorma Isola, György Vereb, János Szöllősi*: Association of ErbB2,  $\beta 1$  integrin and lipid rafts on tumor cells. *Cytometry A*, 2004. May, 59A: 79
2. *Zsolt Fazekas, Miklós Petrás, György Vereb, János Szöllősi*: Double-sided fluorescence energy transfer: A new method for the in situ examination of the associations of ErbB receptors on the surface of tumor cells. *Cytometry A*, 2004. May, 59A: 86
3. *Barbara Zsebik, Miklós Petrás, Jorma Isola, János Szöllősi, György Vereb*: ErbB2 homodimerization and activation in Herceptin resistant and sensitive cell lines. *Cytometry A*, 2004. May, 59A: 113

**Az értekezés témájában elhangzott előadások:**

- ErbB1 – Integrin interakció szerepe gliatumorok terápia rezisztenciájában.  
*Petrás Miklós, Lajtos Tamás, Friedländer Elza, Klekner Álmos, Pintye Éva, Burt G. Feuerstein, Szöllősi János, Vereb György*  
(Miskolci Akadémiai Bizottság tudományos ülése, 2011)
- The ErbB1/EGFR - Integrin Beta 1 Axis: Evidence for Increased Molecular Association in Higher Grade Clinical Glioma Samples Leading to Enhanced Akt Activation and Improved Radiation Resistance.  
*György Vereb, Miklós Petrás, Tamás Lajtos, Álmos Klekner, Éva Pintye, Burt G. Feuerstein, János Szöllősi* (ISAC XXV. International Congress, Seattle, 2010.)
- Az EGFR (ErbB1) - integrin kölcsönhatás szerepe gliatumorok sugárrezisztenciájában. *Vereb György, Petrás Miklós, Lajtos Tamás, Klekner Álmos, Pintye Éva, Szöllősi János* (Magyar Neuronkológia Társaság X. Kongresszusa, Debrecen, 2009.)
- Role of extra chromosome 7p material and epidermal growth factor receptor overexpression in the radiation resistance of glioblastoma tumors.  
*György Vereb, Miklós Petrás, Tamás Lajtos, Álmos Klekner, Éva Pintye, János Szöllősi* (Radiation Damage in Biomolecular Systems, RADAM, Debrecen, 2008.)
- ErbB2,  $\beta 1$ -integrin és lipid raft asszociációja Herceptin (Trastuzumab) szenzitív és rezisztens tumorsejteken. *Petrás Miklós* (TDK - PhD Konferencia, Debrecen, 2005.)
- Association of ErbB2,  $\beta 1$  integrin and lipid rafts on tumor cells.  
*Magda Tufeanu, Zsolt Fazekas, Miklós Petrás, Jorma Isola, György Vereb, János Szöllősi* (ISAC XXII. International Congress, Montpellier, 2004.)
- Double-sided fluorescence energy transfer: A new method for the in situ examination of the associations of ErbB receptors on the surface of tumor cells.  
*Zsolt Fazekas, Miklós Petrás, György Vereb, János Szöllősi*  
(ISAC XXII. International Congress, Montpellier, 2004.)
- ErbB2,  $\beta 1$ -integrin és lipid raft asszociáció tumor sejteken.  
*Petrás Miklós* (TDK - PhD konferencia, Debrecen, 2004.)
- ErbB1 és  $\beta 1$ -integrin molekuláris közelségének hatása az ErbB2 homoasszociációra.  
*Petrás Miklós* (TDK - PhD konferencia, Debrecen, 2003.)

**Az értekezés témájában bemutatott poszterek:**

- ErbB receptorok asszociációjának in situ vizsgálata tumorsejtek felszínén kétoldali fluoreszcencia energiáttranszfer segítségével.  
*Petrás Miklós, Fazekas Zsolt, Vereb György, Szöllősi János*  
(XXXIII. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2003.)

- ErbB2 receptorok homoasszociációja és tirozin foszforilációja humán emlőtumor sejtekben. *Zsebik Barbara, Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Szöllősi János, Vereb György* (XXXIII. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2003.)
- Kétoldali fluoreszcencia energiáttranszfer: egy új módszer ErbB receptorok asszociációjának in situ vizsgálatára tumorsejtek felszínén. *Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Vereb György, Szöllősi János* (Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003.)
- ErbB2 receptorok homoasszociációja és tirozin foszforilációja humán emlőtumor sejtekben. *Zsebik Barbara, Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Szöllősi János, Vereb György* (Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003.)
- Examination of associations of ErbB2,  $\beta$ 1-integrin and lipid rafts on Trastuzumab (Herceptin®) resistant and sensitive tumor cell lines. *Magda Tufeanu, Zsolt Fazekas, Miklós Petrás, Jorma Isola, György Vereb, János Szöllősi* (IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2004.)
- Mapping multimolecular complexes on cell surfaces by dual fluorescence energy transfer imaging. *Zsolt Fazekas, Miklós Petrás, György Vereb, János Szöllősi* (IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2004.)
- ErbB2 Homodimerization and Activation in Herceptin Resistant and Sensitive Cell Lines. *Barbara Zsebik, Miklós Petrás, Jorma Isola, János Szöllősi, György Vereb* (Outstanding Poster Award, ISAC International Congress, Montpellier 2004.)
- ErbB1,  $\beta$ 1-integrin, CD44 és lipid tutajok asszociációjának szerepe U251 NCI glioblastoma klónok eltérő sugárrezisztenciájában. *Petrás Miklós, Horváth Gábor, Burt G. Feuerstein, Klekner Álmos, Szöllősi János, Vereb György* (Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen, 2005.)
- Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and  $\beta$ 1-integrins in the membrane of astrocytoma cell lines, and intraoperative samples, correlate with malignance and radiation resistance. *Miklós Petrás, Álmos Klekner, Burt G. Feuerstein, János Szöllősi, György Vereb* (9<sup>th</sup> European Congress of Neuropathology, Athens, 2008.)
- Expression pattern of invasion-related extracellular matrix molecules in astrocytomas. *Klekner Álmos, Varga Imre, Bognár László, Hutóczki Gábor, Petrás Miklós, Kenyeres Annamária, Tóth Judit, Hanzély Zoltán, Scholtz Beáta* (EORTC-EANO Congress Budapest, 27-28 March, 2009.)
- MRNA expression of EGFRs, integrins and their ligands in astrocytomas. *Hutóczki Gábor, Petrás Miklós, Varga Imre, Bognár László, Kenyeres Annamária, Scholtz Beáta, Tóth Judit, Méhes Gábor, Klekner Álmos* (EORTC-EANO Congress Budapest, 27-28 March, 2009.)
- A glia tumorok sugárrezisztenciájának egyik oka az EGF receptor / beta1 integrin kölcsönhatás és fokozott Akt foszforiláció lehet. *Lajtos Tamás, Petrás Miklós, Pintye Éva, Szöllősi János, Vereb György* (VIII. Magyar Genetikai Kongresszus / XV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009.)
- The Role of Integrins in Enhancing EGFR-Based Radiation Resistance. *Tamás Lajtos, Miklós Petrás, Burt G. Feuerstein, János Szöllősi, György Vereb* (ISAC XXVII. International Congress, Leipzig, 2012.)