

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A RAS JELÁTVITELI ÚTVONALAIT BEFOLYÁSOLÓ FEHÉRJÉK
SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA DAGANATOK KIALAKULÁSÁBAN**

Nagy Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Czifra Gabriella



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

A RAS JELÁTVITELI ÚTVONALAIT BEFOLYÁSOLÓ FEHÉRJÉK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA DAGANATOK KIALAKULÁSÁBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Nagy Zsuzsanna
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Czifra Gabriella, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok:

Dr. Csontos Csilla, PhD

Dr. Sántha Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK, Biofizika és Sejtbiológia Intézet 2.306-os szoba
2014. november 14. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Balla András, PhD

Dr. Zákány Róza, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok:

Dr. Balla András, PhD

Dr. Csontos Csilla, PhD

Dr. Sántha Péter, PhD

Dr. Zákány Róza, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
In Vitro Diagnosztikai Tömb Tanterme
2014. november 14. 13:00 óra

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A Ras fehérje és a hozzá kapcsolt jelátviteli útvonalak kóros működésének vizsgálata a molekuláris onkológiai kutatások igen nagy százalékát teszik ki. A tézisben részletezett munka célja két, potenciális onkogén szereppel bíró Ras jelátviteli útvonalakat szabályozó fehérje szerepének funkcionális vizsgálata tumorok kialakulásában. A tézis két részre tagolódik: (1) a Ras guanil nukleotid releasing peptid 3 szerepének vizsgálata emlő daganatból származó mintákon és sejtvonalakon és a (2) protein kináz C δ proliferációt szabályozó szerepének vizsgálata rhabdomyosarcomában.

A RASGRP3 FEHÉRJE SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA EMLŐ DAGANATBÓL SZÁRMAZÓ MINTÁKON ÉS SEJTVONALAKON

A Ras GTPázok alapvető résztvevői a sejten belüli jelátviteli folyamatoknak. A Mitogén-Aktívált Fehérje Kináz (MAPK) és FoszfoInozitid-3-Kináz (PI3K) kaszkádok aktivitásának szabályozásán keresztül kulcsfontosságú szerepet játszanak pl. a proliferáció, a migráció, az apoptózis és a sejtek túlélésének szabályozásában. A Ras fehérjék a protoonkogének családjába tartoznak, konstitutív aktivációjuk, a hibás jelközvetítés révén tumorok kialakulásához vezethet. A gén amplifikációja és a fehérje overexpressziója számos daganatban megtalálható. Ezen fehérjéknek két állapota van: a GDP-kötött inaktív és a GTP-t kötött aktív forma, mely számos effektor fehérjét képes aktiválni. A Ras család tagjainak GTPáz aktivitását olyan fehérjék szabályozzák, melyek képesek befolyásolni a nukleotid kötési állapotukat. Ezen fehérjék közé tartoznak az ún. guanin nukleotid exchange azaz cserélő faktorok, melyek szabályozó szerepüket azáltal töltik be, hogy elősegítik a kötött GDP disszociációját lehetőséget adva a GTP kötődésére. Számos ilyen faktort azonosítottak; 1998-ban Ebinu és munkatársai fényt derítettek egy új Ras-specifikus cserélő faktorra, ami a Ras guanil nukleotid releasing peptid (RasGRP) elnevezést kapta.

A RasGRP-k szerkezetének különlegessége, hogy rendelkeznek egy ún. C1-doménnel, amely szekvenciájában nagyon hasonló a protein kináz C (PKC) enzimek C1 doménjéhez. Ez a domén tartalmazza a kötőhelyet a diacilglicerol (DAG) és más molekulák pl. forbol-észterek számára. Ezen szabályozó molekulák kiemelt fontosságúak mind a PKC-k, mind a RasGRP-k életében, mert a fehérjék transzlokációját szabályozzák a citoplazmából különböző sejtalkotókhoz mint pl. a sejtmembrán, a maghártya, a Golgi-komplex. A RasGRP1 és RasGRP3 fehérjék aktivitása foszforiláció útján is szabályozott, mely foszforilációt a DAG kötött PKC enzimek végzik. A RasGRP család tagjai közül kiemelkedő szerepet

tulajdonítanak a RasGRP3-nak, mely fehérje overexpressziója több rosszindulatú daganattípusban, például prosztatata tumorokban és melanomában is igazolt. *In vitro* kísérletek alapján a RasGRP3 tumorigenikus szereppel bír; a fehérje expressziójának gátlása csökkenti a prosztatata és melanoma tumor sejtek proliferációját *in vitro* és *in vivo*, valamint a sejtek túlélését is szabályozza. A fehérjének fontos szerepe van a Ras kapcsolt jelátviteli útvonalak aktivitásának szabályozásában, a RasGRP3 expresszió gátlása csökkenti ezekben a sejtekben a növekedési faktor indukált Ras aktivációt.

Figyelembe véve a RasGRP3 potenciális onkogén hatását, célul tűztük ki a fehérje expressziójának illetve funkcionális szerepének vizsgálatát humán ép és eltérő grádusú, invazív, ductális adenocarcinomából származó mintákon és sejtvonalakon.

PROTEIN KINÁZ C δ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA RHABDOMYOSARCOMA SEJTEK *IN VITRO* AND *IN VIVO* PROLIFERÁCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

A protein kináz C (PKC) enzimesalád tagjai szerin/treonin kinázok, amelyek alapvető szerepet játszanak a sejten belüli jelátviteli folyamatokban. A RasGRP fehérjékhez hasonlóan rendelkeznek DAG kötő C1-doménnel. A PKC enzimek szerepe a tumorigenesisben széleskörűen bizonyított. Tumoros sejtekben a Ras/Raf/MEK/ERK $\frac{1}{2}$ valamint a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalak aktivációjának szabályozásán keresztül kulcsfontosságú szerepet játszanak a proliferáció, a migráció, az apoptózis, az angiogenezis és a kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenység szabályozásában. A PKC izoenzimek túlzott mértékű expressziója negatív prognózist és a kemoterápiával szembeni csökkent válasz révén rosszabb túlélési esélyeket jelent a betegek számára. Az PKC enzimek közül a PKC α , β , ϵ és δ izoformák szerepe a leginkább dokumentált különböző tumorok kialakulásában, jelen tézis a nPKC δ szerepének vizsgálatát tűzte ki célul humán rhabdomyosarcomában (RMS). A RMS a rosszindulatú lágyrész daganatok egyik formája; harántcsíkolt izomsejt eredetű daganat, mely 7-8%-kát teszi ki a gyermekkori daganatos megbetegedéseknek. A betegség patogenezise, azok a molekuláris jelátviteli folyamatok, mely a betegség kialakulásához vezetnek a mai napig nem tisztázottak.

Kevés információ áll rendelkezésünkre a PKC izoformák szerepéről humán vázizom sejtek fiziológiás vagy patológias *in vitro* és *in vivo* proliferációjának szabályozásában. A jelen tézisben részletezett kísérleteket megelőző munkánk során C2C12 egér myoblast sejtvonalban már kimutattuk, hogy a nPKC δ izoforma overexpressziója drámaian fokozta a sejtek *in vitro* proliferációját. Fontos eredménynek adódott továbbá, hogy az ezen izoformát kifejező sejtek nagy méretű, gyakran kifeléelyesedő és vérző, valamint (számos esetben) a

kísérleti állat jelentős súlyvesztését és halálát eredményező tumorok kifejlődését eredményezték. Szövettanilag ezen daganatok igen magas sejtosztódási rátával, a rhabdoid differenciálódás teljes hiányával, valamint infiltratív (azaz malignus) növekedési tulajdonságokkal voltak jellemezhetők, mely a kísérleti állat subcutan szöveteinek roncsolódásához vezetett. A nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok által indukált tumorokat malignus rhabdomyosarcomáknak diagnosztizáltuk. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre a humán rhabdomyosarcoma PKC expressziós profiljáról.

Mivel a nPKC δ szerepe bizonyított C2C12 sejtek malignus transzformációjában, kísérleteink során ezen izoforma további funkciójának vizsgálatát tűztük ki célul rhabdomyosarcoma sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésének szabályozásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

HUMÁN MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE

A humán mintákon alapuló kísérletek a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által előírt irányelveknek és a magyar törvényeknek megfelelően kerültek kivitelezésre. A kutatásaink során felhasznált minták sebészi szövetdarabokból származtak. A feldolgozás során a tumorok egy része hematoxin-eozin festés alapú patológiai kiértékelésre került, másik részük folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően, a továbbiakban részletezett Western blot illetve Q-PCR kísérletek során került felhasználásra.

SEJTTENYÉSZTÉS

Kísérleteink során hat emlő-eredetű ductalis adenocarcinomából származó sejtvonalat használtunk. A BT-474 jelű sejtvonal primer, emlő-eredetű ductalis adenocarcinomából származik, az MCF7, T-47D, JIMT-1 és SK-BR-3 sejtvonalak pleurális, míg az MDA-MB-453 pericardiális, metasztatikus ductalis adenocarcinomából izolált sejtvonal. A sejtek közül a T-47D és a BT-474 sejtvonalat RPMI-1640 Medium-ban tenyésztettük, amelyet 10 V/V% hővel inaktivált embrionális borjú szérummal (FBS), 2 mM L-glutaminnal, 50 IU/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel, valamint a T-47D sejtvonal esetén 0.2 U/ml inzulinnal egészítettünk ki. Az MCF7, a JIMT-1 és az SK-BR-3 sejtkultúrákat Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) tenyésztettük, amelyet 10 V/V% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 50 IU/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel, az MCF7 sejtvonalnál 0,2 mg/ml inzulinnal, a JIMT-1 sejteknél 0,6 U/l inzulinnal egészítettünk ki. Az MDA-MB-453 sejtvonalat Leibovitz's L-15 Médiumban tartottuk fent, amelyet 10 V/V% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal és 50 IU/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki.

A humán rhabdomyosarcoma (RD) sejteket DMEM-ben tenyésztettük, amelyet 10 V/V% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 50 IU/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki.

A sejtvonalakat monolayer formában 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben, 37°C-on tenyésztettük. A sejteket 90%-os konfluencia elérése után passzáltuk.

IMMUNHISZTOKÉMIA

Az immunhisztokémiai kísérleteket 4%-os formalinnal fixált, paraffinba ágyazott metszeteken végeztünk. Az immunfestés első lépéseként a paraffint kioldottuk a metszetekből

xilol, híguló alkoholsor és desztillált vizes mosással, 5-5 perces inkubációt alkalmazva. Ezt követően antigén feltárás céljából 10 percig citrát pufferben [pH 6.0] hőkezeltük a mintákat, majd egy desztillált vizes mosást követően szintén 10 percig H₂O₂ 3 %-os vizes oldatában tartottuk a metszeteket az endogén peroxidáz gátlása érdekében. Ezután desztillált vizes, majd PBS pufferben való mosást alkalmaztunk, amit a kötőhelyek blokkolása követett blokkoló oldat (1 m/m% BSA és 0,6 % Triton X-100 tartalmú PBS) segítségével. A mintákat inkubáltuk az adott kísérletnek megfelelő elsődleges antitesttel, majd PBS-ben történő mosás következett. A következő lépésben a mintákat EnVision rendszerrel inkubáltuk 30 percen keresztül. Az immunreakciót diaminobenzidin (DAB) reagens alkalmazásával tettük láthatóvá. A sejtmagokat hematoxilinnel festettük, végül a metszeteket vizes bázisú fedőanyaggal fedtük le. A szöveti metszeteken történő vizsgálatok során is végeztünk negatív kontroll kísérleteket, melyek az elsődleges antitest elhagyásával vagy egy, a gyártó által biztosított blokkoló peptid alkalmazásával történtek.

MIKROSZKÓPIA

Az immunhisztokémiai kísérletek eredményeinek mikroszkópos vizsgálatához Nikon Eclipse 600W konvencionális, fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztunk. A felvételeket a mikroszkóphoz csatolt „RT colour CCD kamera” és a Kodak Spot v3.5 program segítségével detektáltuk. A felvételeket az Image J image analízáló szoftver segítségével analizáltuk. A proliferáló (Ki67 pozitív) sejtek számát öt, véletlenszerűen elhelyezett, egyenlő nagyságú területen belül határoztuk meg; a kapott értékeket az adott területen belül megszámlolt teljes sejtszámmra normalizálva tüntettük fel. Az egy csoportba tartozó eredményeket átlagoltuk.

MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TECHNIKÁK

WESTERN BLOT

A Western blot kísérletekhez mind szövet-, mind teljes sejtlizátumot használtunk fel. A szöveteket folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, dörzsmozsár segítségével mechanikusan porítottuk, majd detergens mixben lizáltuk őket. A sejttényészeteket PBS-ben mostuk, majd detergens mixben arattuk. A szövet- és sejtlizátumokon jégen ultrahangos feltárást (szonikálást) végeztünk, majd BCA protein assay segítségével meghatároztuk fehérjetartalmukat. Ezután a minták proteintartalmát 1-4 µg/µl-re állítottuk be, majd nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferben 10 percig forrásban lévő vízben denaturáltuk. Az így

elkészített mintákból azonos mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk 140 V konstans feszültségen. A gélelektroforézishez 10%-os gél használtunk, amelyre 20-60 µg mennyiségben vittük fel a mintákat. Ezután a gélben lévő fehérjéket BioBond nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a membrán szabad kötőhelyeit 5 %-os sovány tejport tartalmazó PBS-sel szobahőmérsékleten 30 percig blokkoltuk. Ezt követően a membránt a megfelelő elsődleges antitesttel inkubáltuk 5 % sovány tejport tartalmazó PBS-ben egy éjszakán át 4 °C-os hőmérsékleten. Az inkubáció után a membránt 3x10 percig PBST oldatban mostuk, majd az elsődleges antitestnek megfelelő torna-peroxidázzal (HRP) konjugált, másodlagos antitesttel inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Az immunjeleket minden esetben kemilumineszcens SuperSignal® West Pico illetve Femto Chemiluminescent Substrate kit segítségével tettük láthatóvá, KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülék felhasználásával. Az egyenletes mintafelvitel ellenőrzésére a β-aktin vagy GAPDH belső kontrollokat alkalmaztunk. A membránt 30 percig PBST-ben történő mosást követően az adott belső kontroll elsődleges antitesttel, majd annak megfelelő másodlagos antitesttel a fentebb ismertetett módon újrajelöltük. A kapott immunjelek digitális rögzítését ebben az esetben is a Kodak MI 4.0.5 programmal végeztük.

Q-PCR

A teljes RNS-t TRIzol felhasználásával izoláltuk, majd a gyártó protokolljának megfelelően (az esetleges genomi DNS szennyezés eliminálására) DNáz kezelést végeztünk. Ezt követően a teljes RNS 1 µg-jából kiindulva 15 IU AMV reverz transzkriptázt, 1 IU rekombináns RNasin ribonukleáz inhibitort és 0,025 µg/µl random primert felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikációs reakciót TaqMan primerekkel és próbákkal végeztük. A génexpresszió relatív mennyiségét a ΔCT módszer segítségével határoztuk meg. A Q-PCR kísérleteket ABI Prism 7000 készüléken végeztük el.

TRANSZFEKCIÓ

RASGRP3 GÉNCSENDESÍTÉS

A RasGRP3 fehérje géncsenDESítését a GenScript által készített pRNA-H1.1/Retro retrovirális vektor segítségével végeztük. Kísérleteink során egy RasGRP3 fehérje expresszióját gátló shRNS-t (shRasGRP3), illetve kontrollként scrambled (kevert) shRNS szekvenciákat alkalmaztunk. Az infektív partikulumok előállítását, az infektív titer

meghatározását és a T-47D és MCF7 gazdasejtek fertőzését a CloneTech protokollja alapján végeztük el. A transzdukált sejtenyészeteken Hygromycin B alapú szelekciót végeztünk, majd a kísérleteinket az antibiotikum rezisztens klónokon hajtottuk végre.

nPKC δ OVEREXPRESSZIÓ

A nPKC δ és a domináns negatív nPKC δ mutáns (DN-nPKC δ) cDNS szekvenciáit egy metallothionein promóter vezérelt eukarióta expressziós vektorba (p ϵ MTH) ligáltuk. Az RD sejteken kontrollként az üres vektorral (p ϵ MTH) illetve a nPKC δ vagy DN-nPKC δ szekvenciákat tartalmazó vektorokkal Lipofectamin alapú transzfekciót hajtottunk végre. A transzfekciót követően a sejteken Geneticin alapú szelekciót végeztünk, majd a kísérleteinket az antibiotikum rezisztens klónokon hajtottuk végre.

SEJTEK PROLIFERÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Kísérleteink során a CyQuant Assay segítségével határoztuk meg a T-47D és MCF7 sejtek proliferációját. Ezen assay során a sejtek DNS tartalmát határozzuk meg; A CyQuant egy fluoreszcens festék, mely a sejtek DNS-éhez kötődik, így az adott fluoreszcencia mértéke egyenesen arányos a proliferáció mértékével. A mérések 24 óránként, 5 napon keresztül zajlottak. A CyQuant festék fluoreszcencia intenzitását FlexStation III spektrofluorométerrel végeztük 480 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhosszokat alkalmazva.

Szintén a CyQuant Assay segítségével határoztuk meg a T-47D és MCF7 sejtek kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységeinek változását. A sejteket különböző koncentrációkban alkalmazott kemoterápiás szerekkel (Tamoxifen és Herceptin) 72 órán keresztül kezeltük, majd a kezelési idő letelte után az előzőekben leírtaknak megfelelően proliferációs assay-t végeztük.

Az RD sejtek növekedését MTT alapú kolorimetriás assay segítségével határoztuk meg. A módszer alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzime az MTT-ben [3- (4,5-dimetiltiazol- 2-il-) 2,5-difenil tetrazólium bromid] található tetrazólium gyűrűt hasítja. Ennek hatására formazán kristályok keletkeznek, melyek mennyisége savas oldásukat követően kolorimetriásan mérhető. A mért abszorbancia egyenesen arányos az élő sejtek számával. A sejtekhez 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot adtunk, majd 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a sejtekhez MTT-szolubilizáló oldatot adtunk és 30 percig 25 °C-on

inkubáltuk, majd FlexStationIII (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) segítségével kolorimetriás mérést végeztünk 567 nm-en.

A SEJTEK TÚLÉLÉSÉNEK MEGHATÁROZÁSA

A sejtek túlélésének meghatározására Annexin-V/propídium jodid (PI) kettős jelölést végeztünk. A sejteket CMF-PBS-sel mostuk, 1 μ M koncentrációban jelöltük Annexin-V-re, majd 20 percig 4 °C-on inkubáltuk. A propídium jodidot 5 μ g/ml koncentrációban 10 perccel a FACScan flow citométerrel történő mérés előtt adtuk a sejtekhez. Az adatok kiértékeléséhez FSC Express szoftvert használtunk.

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik első markere. A sejtek mitokondriális membránpotenciáljának meghatározására MitoProbe™ DilC1(5) Assay-t használtunk. A DilC1 egy mitokondriális membránpotenciál érzékeny festék, mely az ép, membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokban halmozódik fel. Az apoptotikus folyamatok esetén a sejtek mitokondriális membránpotenciálja csökken, így kevesebb festék halmozódik fel bennük, ami a festék fluoreszcenciájának csökkenésében nyilvánul meg. Az assay során a sejteket a gyártó utasításai szerint DilC1 reagenssel 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk, és a festék fluoreszcenciáját 630 nm-es excitációs és 670 nm-es emissziós hullámhosszon mértük FlexStation III spektrofluorométer segítségével.

IN VIVO KÍSÉRLETEK

A SCID egér kísérletek a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által előírt irányelveknek és a magyar törvényeknek megfelelően kerültek kivitelezésre a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikáján. 4 x 10⁶ mennyiségű sejtet injektáltunk az egerekbe. Miután jelentős mértékű tumor növekedést figyeltünk meg, az állatokat eutanizáltuk, a kifejlődött tumorokat kimetszettük, súlyukat, három dimenziós méretüket lemértük és hematoxin-eozin alapú patológiai diagnózisnak valamint Ki67 proliferációs analízisnek vetettük alá.

STATISZTIKAI ANALÍZIS

Adataink feldolgozásához a Microcal Software Inc. által kifejlesztett Origin Pro Plus 6 szoftvert használtuk. Statisztikai elemzéseink során a szignifikáns különbség (p<0,05) megállapításához Student-féle kétmintás *t*-próbát végeztünk.

EREDMÉNYEK

A RASGRP3 FEHÉRJE SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA EMLŐ DAGANATBÓL SZÁRMAZÓ MINTÁKON ÉS SEJTVONALAKON

A RasGRP3 expresszálódik emlő-eredetű, ductalis adenocarcinomából származó szöveteken és sejtvonalakon

Kísérleteink első lépéseként megvizsgáltuk humán ép emlőszövet, valamint eltérő grádusú, invazív ductális adenocarcinomából származó minták RasGRP3 és phosphoRasGRP3 expresszióját mind mRNS (Q-PCR), mind fehérje szinten (Western blot). Eredményeink szerint a RasGRP3 mind RNS, mind fehérje szinten kifejeződik humán emlő tumorokban. A fehérje expressziójának mértéke a tumoros mintákban magasabb az ép szövetekhez képest. Ez a tendencia a foszfoRasGRP3 fehérje szintű expressziója esetében is megfigyelhető. A fehérje sejteken belüli lokalizációjának vizsgálatához immunhisztokémia kísérleteket végeztünk, mely eredménye szerint a RasGRP3 jellemzően a sejtek citoplazmájában fejeződik ki, míg a fehérje foszforilált formája nukleáris/perinukleáris elhelyezkedést mutat.

In vitro kísérleteink során megvizsgáltunk egy primer ductális adenocarcinomából származó (BT-474) és különböző metasztatikus (MDA-MB-453, JIMT-1, MCF7, SK-BR-3, T-47D) sejtvonalak RasGRP3 expresszióját mind mRNS, mind fehérje szinten. A kísérletek során a PC-3 tumoros prosztata sejtvonalat pozitív kontrollként alkalmaztuk. Eredményeink szerint minden sejtvonal expresszálja a RasGRP3 fehérjét, a BT-474 primer tumorból származó, illetve az MDA-MB-453 metasztatikus sejtvonalnál ez az expresszió alacsonyabb mértékű a többi sejtvonalakhoz képest.

RasGRP3 géncsendesítés az MCF7 és T-47D sejtvonalakon

Mivel a RasGRP3 fehérjének szelektív gátlószere nem ismert, ezért az RNS interferencia módszerét választottuk a fehérje kifejeződésének specifikus gátlására. Ezen kísérletek során létrehoztunk egy olyan RasGRP3 specifikus shRNS-t expresszáló retrovírust, amelynek segítségével stabil géncsendesítést végezhattünk az MCF7 és T-47D sejtvonalakon, lehetőséget teremtve a RasGRP3 géncsendesítése következtében kialakult változások, így a proliferáció ütemének, a sejtek életképességének és az apoptotikus sejthalál folyamatainak kvantitatív vizsgálatára. A kísérletek során kontrollként scrambled shRNS-t használtunk. A géncsendesítés sikerességét Western blottal ellenőriztük, a funkcionáló RasGRP3 shRNS-sel

transzfektált tenyészetekben igen jelentős RasGRP3 expresszió csökkenést sikerült elérni mindkét sejtvonalon.

A RasGRP3 géncsökkentés csökkenti a sejtek proliferációját

A sejtek proliferációjának megítélésére CyQuant Assay-t használtunk, mely egy a sejtek DNS-éhez kötődő fluoreszcens festéken alapuló módszer. A sejtek ezen festékkel való jelölése után a mért fluoreszcencia intenzitásból egyenes arányban következtetni lehet a proliferáció mértékére. Eredményeink szerint a scrambled szekvencia a sejtek proliferációjára nem volt hatással, a RasGRP3 expressziójának gátlása azonban a proliferáció mértékének szignifikáns csökkenését okozta mind az MCF7, mind a T-47D tenyészeteken.

A RasGRP3 géncsökkentés hatása a sejtek túlélésére

A RasGRP3 szerepének vizsgálatára a sejtek túlélésének szabályozásában Annexin-V/propidium jodid kettős jelölést végeztünk. A flow citométerrel végzett analízis eredményei szerint a RasGRP3 expresszió gátlása apoptózist indukált az MCF7 sejtekben, míg a T-47D sejtek túlélésére nem volt hatással. Eredményünk megerősítésére kvantitatív fluorimetriás méréseket végeztünk a mitokondriális membránpotenciál detektálására. Megállapítottuk, hogy a RasGRP3 expresszió gátlása csökkenti a mitokondriális membránpotenciált az MCF7 sejtekben, így apoptózist indukál, míg a T-47D sejtekben ilyen változást nem tapasztaltunk.

A RasGRP3 géncsökkentés hatása a sejtek kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységére

A Ras fehérjéhez kapcsolt jelátviteli útvonalaknak szerepe van a klinikumban igen széleskörűen alkalmazott szer, a Tamoxifennel és a Herceptinnel szembeni rezisztencia kialakulásában. További kísérleteink során megvizsgáltuk a RasGRP3 géncsökkentés hatását a sejtek ezen kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységére. Eredményeink alapján a T-47D sejtek a RasGRP3 géncsökkentés következtében érzékenyebbek válnak mind Tamoxifenre, mind Herceptinre; az adott szerek alacsonyabb koncentrációban alkalmazva is képesek a RasGRP3 géncsökkentett sejtek növekedését gátolni a nem transzfektált kontroll illetve scrambled kontroll tenyészetekkel összehasonlítva. Az MCF7 sejtek Tamoxifen és Herceptin érzékenységét a RasGRP3 expresszió nem befolyásolja.

A RasGRP3 géncsendesítés hatása a sejtek tumorigenitására

A RasGRP3 géncsendesítés hatását mindkét sejtvonal tumorigenitására SCID egér modell segítségével vizsgáltuk. Mindkét sejtvonal kontroll, scrambled kontroll és RasGRP3 géncsendesített tenyészetét az egerekbe szubkután beinjektáltuk, a kifejlődött tumorokat eltávolítottuk, súlyukat lemértük és hisztopatológiai elemzést végeztünk rajtuk. Mindkét sejtvonal esetén a RasGRP3 géncsendesítés a tumor növekedésének szignifikáns csökkenését okozta. A hisztopathológiai elemzés igazolta, hogy a T-47D sejtekből kifejlődött tumorokra az infiltratív természetű ún. „Pushing típusú” növekedés jellemző, mely mechanikai nyomást fejt ki a környező szövetekre; nekrotikus szövetterületek gyakran előfordultak ezekben a tumorokban. Az MCF7 sejt eredetű daganatok szövettani megjelenése azonban más jellegű, ezen sejtek differenciáltabb, nem infiltratív tumorokat képeznek. A kifejlődött tumorok proliferációs rátájának jellemzésére Ki67-specifikus immunfestést végeztünk. Az immunhisztokémia analízis szerint az MCF7 sejtek esetén, a RasGRP3 géncsendesített tenyészetből kifejlődött tumorokban a Ki67 pozitív sejtek aránya kevesebb a scrambled kontroll tenyészetekhez képest. A T-47D sejtek esetén szignifikáns különbséget a Ki67 expresszióban nem tapasztaltunk.

A RasGRP3 géncsendesítés hatása a növekedési faktor indukált Akt, ERK 1/2 és ösztrogén receptor aktivációra

Az inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I) és az epidermális növekedési faktor (EGF) a Ras útvonal aktiválásán keresztül növeli az emlő tumor sejtek proliferációját és invazivitását. Kísérleteink utolsó szakaszában IGF-I and EGF kezelést követően Western blot segítségével megvizsgáltuk a RasGRP3 géncsendesítés hatását két, Ras effektor fehérje az Akt és ERK 1/2 aktivációjára. Megállapítottuk, hogy mindkét sejtvonal esetén a RasGRP3 géncsendesítés csökkenti a növekedési faktorok által indukált Akt és ERK 1/2 foszforilációt. Ezen effektor fehérjéknek fontos szerepe van az ösztrogén receptor aktivitásának szabályozásában, az Akt és ERK 1/2 aktiváció csökkenésének révén az ösztrogén receptor foszforiláltsága is csökkent. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a fehérje szerepét az ösztrogén receptor aktivációjának szabályozásában, Q-PCR segítségével megvizsgáltuk a RasGRP3 géncsendesítés hatását négy, ösztrogén szabályozott gén expressziójára, nevezetesen a progeszteron receptor, a katepszin D, a citokróm C és lorikrin expressziójára. Eredményeink szerint a lorikrin kivételével, a gének kifejeződése jelentős mértékben csökkent a RasGRP3 géncsendesített tenyészetekben.

A RasGRP3 géncsendesítés hatása az IGF-IR, EGFR és HER-2 receptorok expressziójára

Jelátviteli kísérleteink utolsó lépéseként, Q-PCR és Western blot segítségével megvizsgáltuk a RasGRP3 géncsendesítés hatását az IGF-IR, EGFR és HER-2 receptorok expressziójára. Eredményeink szerint a fehérje gátlása csökkentette az IGF-IR és EGFR kifejeződését az MCF7 sejtekben, míg a T-47D sejtekben nem volt hatással a receptorok expressziójára. A RasGRP3 géncsendesítés nem befolyásolta a HER-2 receptor expressziójára egyik sejtvonalban sem.

PROTEIN KINÁZ C δ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA RHABDOMYOSARCOMA SEJTEK *IN VITRO* AND *IN VIVO* PROLIFERÁCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Az nPKC δ overexpressziója rhabdomyosarcoma sejtvonalon

Az nPKC δ funkcionális szerepének vizsgálatára létrehoztunk egy nPKC δ -t overexpresszáló vektort, amellyel a humán rhabdomyosarcoma eredetű RD sejteket transzfektáltuk. A kísérletek során kontrollként üres vektorral illetve a DN-nPKC δ mutánssal transzfektált tenyészeteket használtunk. Az overexpresszió sikerességét Western blottal ellenőriztük, eredményeink szerint a nPKC δ transzfektált tenyészetekben igen jelentős nPKC δ expresszió növekedést sikerült elérni a kontroll tenyészetekhez képest.

nPKC δ overexpresszió növeli az RD sejtek növekedését

A sejtek növekedésének megítélésére mitokondriális enzimaktivitást mérő MTT assay-t használtunk. Eredményeink szerint az nPKC δ overexpresszió szignifikánsan növelte a sejtek növekedését összehasonlítva az üres vektort illetve a DN-nPKC δ mutánst expresszáló tenyészetekkel.

nPKC δ overexpresszió hatása az IGF-I indukált ERK $\frac{1}{2}$ aktivációra

Az IGF-I jelátviteli útvonal kiemelkedő szereppel bír a rhabdomyosarcoma sejtek életképességének szabályozásában, ezért Western blot segítségével megvizsgáltuk a nPKC δ overexpresszió hatását az ERK $\frac{1}{2}$ kináz aktivációjára. Eredményeink szerint, a nPKC δ overexpresszió növeli az IGF-I indukált ERK $\frac{1}{2}$ foszforilációt.

nPKC δ overexpresszió hatása a sejtek tumorigenitására

A nPKC δ overexpresszió hatását a sejtek tumorigenitására SCID egér modell segítségével vizsgáltuk. Az nPKC δ és DN-nPKC δ formákat overexpresszáló, valamint az üres p ϵ MTH vektorral transzfektált kontroll tenyészeteket SCID egerekbe injektáltuk, a kifejlődött tumorokat eltávolítottuk és az előzőekben ismertetett módon hisztopatológiai elemzést végeztünk rajtuk. Habár az nPKC δ overexpresszió a tumornövekedés mértékét szignifikánsan nem befolyásolta, de az elemzés során ezen formával transzfektált sejtek növekedése bizonyult a leginfiltratívabbnak. A Ki67-specifikus immunfestés igazolta, hogy a nPKC δ -át overexpresszáló sejtekből kifejlődött tumorok proliferációs rátája volt a legmagasabb a kontroll tenyészetekkel összehasonlítva.

MEGBESZÉLÉS

A RASGRP3 FEHÉRJE SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA EMLŐ DAGANATBÓL SZÁRMAZÓ MINTÁKON ÉS SEJTVONALAKON

Korábbi kísérleti eredmények már bebizonyították, hogy a RasGRP3 fehérje fontos szerepet tölt be a prosztata tumoros és a melanoma sejtek tumorigenitásának kialakításában, azonban -legjobb tudásunk szerint- a jelen munka bizonyítja elsőként a fehérje overexpresszióját és onkogenikus szerepét humán emlő daganatban. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a RasGRP3 fehérje mind mRNS mind fehérje szinten kifejeződik humán daganatos, eltérő grádusból származó emlő szöveti mintákban. Kimutattuk továbbá, hogy a RasGRP3 expressziója a tumoros szövetekben magasabb a kontroll mintákhoz képest. Immunhisztokémia segítségével megállapítottuk, hogy a RasGRP3 jellemzően a sejtek citoplazmában helyezkedik el, míg a fehérje –feltételezhetően- aktív formája a foszfoRasGRP3 nukleáris/perinukleáris immunreakciót mutat. Kísérleteink következő szakaszában *in vitro* körülmények között 6 emlő-eredetű tumoros sejtvonalon vizsgáltuk a RasGRP3 kifejeződését (primer: BT-474; metasztatikus: MCF7, T-47D, SK-BR-3, MDA-MB-453, JIMT-1). A Q-PCR-ral és Western blottal kapott eredményeink azt mutatják, hogy a sejtvonalak expresszálják a fehérjét, ezen expresszió mértéke a metasztatikus sejtvonalakban magasabb, mint a primer sejtkultúra esetében. A RasGRP3 biológiai funkcióinak vizsgálatához két metasztatikus sejtvonalon (MCF7 és T-47D) shRNS technikával RasGRP3 géncsökkentést végeztünk. A sejtek proliferációjának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a RasGRP3 expressziójának gátlása a proliferáció mértékének szignifikáns csökkenését okozta mindkét sejtvonal esetében. Kísérleteink során annexin-V/propidium jodid kettős jelölést illetve DiIC₁ mitokondriális membránpotenciált meghatározó assay segítségével megállapítottuk, hogy a RasGRP3 kifejeződésének csökkentése az MCF7 sejtekben apoptózist indukált. A RasGRP3 szerepe feltételezhető a sejtek Tamoxifen és Herceptin kemoterápiás szerekekkel szembeni érzékenységének kialakításában. A fehérje expressziójának gátlásával a T-47D sejtek rezisztenciája a szerekekkel szemben jelentősen csökkent. A tenyészetek tumorigenitásának vizsgálatára SCID egér modellt alkalmaztunk. Eredményeink szerint a RasGRP3 géncsökkentés következtében a sejtek tumorigenitása, az egerekben kifejlődő tumorok mérete szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll tenyészetekhez képest. Munkánk utolsó szakaszában Western blot segítségével megvizsgáltuk a RasGRP3 funkció gátlásának hatását két Ras effektor fehérje az Akt és ERK 1/2 kinázok aktivitására, valamint az IGF-I és EGF receptorok expressziójára. Eredményeink szerint a fehérje gátlásával a Ras kapcsolt jelátviteli útvonalak aktivitása jelentős mértékben csökkenthető. Mindemellett

megállapítottuk, hogy a RasGRP3 géncsendesítéssel a növekedési faktor receptorok expressziója a T-47D sejtekben szignifikánsan csökkent. Eredményeink alapján feltételezhető a RasGRP3 fehérje onkogén szerepe emlő daganatok kialakításában és a sejtek növekedésének, túlélésének illetve kemoterápiás érzékenységének szabályozásában, felvetve a fehérje potenciális jelentőségét a fenti daganat esetleges terápiájában.

PROTEIN KINÁZ C δ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA RHABDOMYOSARCOMA SEJTEK *IN VITRO* AND *IN VIVO* PROLIFERÁCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

A PKC izoenzimek proliferációban betöltött szerepének vizsgálata során már korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy C2C12 egér myoblast és primer humán tenyésztett vázizomsejtek expresszálják a nPKC δ izoformát. A jelen kísérleteket megelőző munkánk során C2C12 sejteken kimutattuk, hogy a nPKC δ rekombináns overexpressziója kiemelt szereppel bír a sejtek proliferációjának, differenciációjának és tumorigenitásának szabályozásában. Habár humán rhabdomyosarcomában a különböző PKC izoenzimek overexpressziója már igazolt, a jelen tézisben részletezett kísérletek adják az első bizonyítékot a fehérje funkcionális szerepére vonatkozóan. Az nPKC δ overexpresszióját követően az RD sejtekben, MTT assay segítségével sikeresen bizonyítottuk, hogy ez az izoforma fokozta a sejtek *in vitro* proliferációját; továbbá, nagy méretű és infiltratív tumorok kifejlődését eredményezték SCID egerekben. Szövettanilag ezen daganatok magas sejtosztódási rátával és malignus növekedési tulajdonságokkal voltak jellemezhetők, mely a kísérleti állat subcutan szöveteinek (zsír- és kötőszövet) roncsolódásához vezetett. Korábbi kísérleteink során megállapítottuk, hogy C2C12 sejteken a nPKC δ izoforma kulcsfontosságú szereppel bír az IGF-I vázizomsejt proliferációt serkentő hatásának kifejlődésében és a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik. Ismerve az IGF-I jelátviteli útvonal fontos szerepét humán RMS sejtek proliferációjának és invazivitásának szabályozásában kísérletünk utolsó szakaszában Western blot segítségével megvizsgáltuk a nPKC δ izoforma overexpressziójának hatását az ERK 1/2 kináz aktivitására. Eredményeink szerint a fehérje overexpressziójával a MAPK útvonal aktivitása szignifikánsan fokozódik szemben a nPKC δ domináns negatív mutánsát kifejező sejtekkel. Eredményeink alapján feltételezhető a nPKC δ izoforma potenciális onkogén szerepe humán rhabdomyosarcoma kialakításában és a sejtek növekedésének szabályozásában.

ABSZTRAKT

A RasGRP3, a Ras-specifikus guanin nukleotid exchange faktorok (RasGEFs) közé tartozó RasGRP (Ras guanil nukleotid releasing peptid) család tagja. A RasGRP3 fehérje potenciális onkogén hatású molekula; már több rosszindulatú daganattípusban, például a prosztata adenocarcinómában és melanómában is leírták a RasGRP3 génjének amplifikációját és a fehérjetermék overexpresszióját. A protein kináz C (PKC) izoenzimeszaládba tartozó nPKC δ a jelátviteli folyamatok egyik központi szabályozó molekulája, mely overexpressziója és kóros működése számos malignus elváltozásban igazolt. Mindkét fehérje fontos szereppel bír a Ras kapcsolt jelátviteli útvonalak szabályozásában, mely konstitutív aktivációja felelős a malignus elváltozások kialakulásáért. A fehérjék potenciális onkogén hatását figyelembe véve kísérleteink során egyrészt megvizsgáltuk a RasGRP3 kifejeződését és funkcionális szerepét az egyik legrosszindulatúbb daganattípusban, az emlő-eredetű ductalis adenocarcinómában, továbbá az nPKC δ izoforma szerepét rhabdomyosarcoma sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésének szabályozásában.

Kísérleteink során sikerrel igazoltuk a RasGRP3 gén- és fehérjeszintű jelenlétét humán, emlő-eredetű ductalis adenocarcinómából származó szöveti mintákon. Megállapítottuk, hogy míg a RasGRP3 jellemzően a sejtek citoplazmájában expresszálódik, addig az aktív, vagyis foszforilált forma nukleáris/perinukleáris elhelyezkedést mutat. Ezt követően primer (BT-474) és metasztatikus (MCF7, T-47D, SK-BR-3, MDA-MB-453, JIMT-1) emlő tumoros sejtvonalakon mind mRNS, mind fehérje szinten sikerült kimutatnunk a fehérje expresszióját. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a primer sejtvonal RasGRP3 expressziójának mértéke kisebb, mint a metasztatikus társaié. Ennek alapján a RasGRP3 funkcionális szerepét tisztázandó virális transzfekciót felhasználva RasGRP3 géncsendesített tenyészeteket hoztunk létre az MCF7 és T-47D sejtvonalakon. A RasGRP3 expresszió gátlása okozta esetleges sejtleletani változásokat, így a proliferáció mértékét és a kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységet CyQuant assay-vel, az esetlegesen kialakuló apoptózis mértékét Annexin-V/propidium jodid kettős festéssel és DilC fluorimetriás mérésekkel követtük nyomon. Jelátviteli kísérleteink során az Akt és ERK $\frac{1}{2}$ kinázok aktivitását, valamint az IGF-IR és EGFR növekedési faktor receptorok kifejeződését Western blot segítségével vizsgáltuk. Az eredmények alapján megállapíthattuk, hogy a fehérje expressziójának gátlása a sejtek proliferációját *in vitro* és *in vivo* szignifikánsan csökkenti, valamint apoptotikus folyamatokat indukál az MCF7 sejtvonalban. A fehérje expressziójának gátlásával továbbá

csökkent a T-47D sejtek rezisztenciája a kemoterápia során használt Tamoxifennel és Herceptinnel szemben. Jelátviteli kísérleteink során megállapítottuk, hogy a fehérje gátlásával a Ras kapcsolt jelátviteli útvonalak aktivitása jelentős mértékben csökkenthető.

A munka másik részében, az nPKC δ overexpresszióját követően az RD sejtekben, MTT assay segítségével sikeresen kimutattuk, hogy ez az izoforma fokozza a sejtek *in vitro* és *in vivo* proliferációját. Jelátviteli kísérleteink során igazoltuk, hogy a nPKC δ izoforma a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik rhabdomyosarcomában; a fehérje overexpressziójával az ERK $\frac{1}{2}$ kináz aktivitása szignifikánsan fokozódik.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy mindkét fehérje potenciális onkogén szereppel bír az említett tumorok kialakításában és a sejtek növekedésének szabályozásában.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Jelölt: Nagy Zsuzsanna
Neptun kód: F8R4V7
MTMT azonosító: 10035938
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Iktatószám: DEENKÉTK/321/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Czifra, G., Szöllősi, A., **Nagy, Z.**, Boros, M., Juhász, I., Kiss, A., Erdődi, F., Szabó, T., Kovács, I., Török, M., Kovács, L., Blumberg, P.M., Bíró, T.: Protein kinase cδ Promotes proliferation and induces malignant transformation in skeletal muscle.
J. Cell. Mol. Med. "accepted by publisher" (2014)
IF:3.698 (2013)
2. **Nagy, Z.**, Kovács, I., Török, M., Tóth, D., Vereb, G., Buzás, K., Juhász, I., Blumberg, P.M., Bíró, T., Czifra, G.: Function of RasGRP3 in the formation and progression of human breast cancer.
Mol. Cancer. 13, 1-17, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-13-96>
IF:5.397 (2013)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



További Közlemények

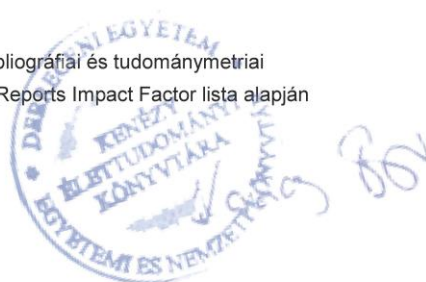
3. Nagy, D., Kosztka, L., Pap, P., **Nagy, Z.**, Rusznák, Z., Csernoch, L., Szűcs, G.: Cytoplasmic Ca²⁺ concentration changes evoked by muscarinic cholinergic stimulation in primary and metastatic melanoma cell lines.
Melanoma Res. 21 (1), 12-23, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283414477>
IF:2.187
4. Kosztka, L., Rusznák, Z., Nagy, D., **Nagy, Z.**, Fodor, J., Szűcs, G., Telek, A., Gönczi, M., Ruzsnavszky, O., Szentandrassy, N., Csernoch, L.: Inhibition of TASK-3 (KCNK9) channel biosynthesis changes cell morphology and decreases both DNA content and mitochondrial function of melanoma cells maintained in cell culture.
Melanoma Res. 21 (4), 308-322, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283462713>
IF:2.187
5. Kőszeghy, Á., Pál, B., Pap, P., Pocsai, K., **Nagy, Z.**, Szűcs, G., Rusznák, Z.: Purkinje-like cells of the rat cochlear nucleus: A combined functional and morphological study.
Brain Res. 1297, 57-69, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.041>
IF:2.463

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,932

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
9,095

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.10.02.



A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2./B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

