EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A SEJTMEMBRÁN MIKRODOMÉNEK SZERVEZŐ-MODULÁLÓ SZEREPE DAGANATSEJTEK JELÁTVITELÉBEN ÉS A DAGANATTERÁPIÁBAN

Dr. Szöőr Árpád



DEBRECENI EGYETEM GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2016

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A SEJTMEMBRÁN MIKRODOMÉNEK SZERVEZŐ-MODULÁLÓ SZEREPE DAGANATSEJTEK JELÁTVITELÉBEN ÉS A DAGANATTERÁPIÁBAN

Dr. Szöőr Árpád Témavezető: Dr. Vereb György



DEBRECENI EGYETEM Gyógyszerészeti Tudományok Doktori iskola

Debrecen, 2016

TÁRGYSZAVAK

Lipid-tutajok, PDGFR, TRAIL-R, ciszplatin

KEY WORDS

Lipid rafts, PDGFR, TRAIL-R, cisplatine

TARTALOMJEGYZÉK

1.	. Rövidítések jegyzéke	1
2	. Bevezetés	3
3.	. Irodalmi áttekintés	4
4.	 3.1. A lipid-tutajok 3.2. A lipid-tutajok szerepének vizsgálatában felhasznált molekuláris modellrendszerek 3.2.1. A PDGF receptor	4 8 8 13 17
5	. Anyagok, módszerek	18
	 5.1. Anyagok, törzsoldatok 5.2. A kísérletekhez használt sejtvonalak 5.3. Glioblasztóma sejtek PDGF stimulálása 5.4. A vastagbél és prosztata karcinóma sejtek kezelése TRAIL ligandummal és 	18 22 23
	platinaszármazékokkal 5.5. Immunfluoreszcenciás jelölések 5.6. Konfokális mikroszkópia 5.7. Digitális képfeldolgozás 5.7.1. Kolokalizáció meghatározása a keresztkorreláció alapián	24 24 25 26 26
	 5.7.2. Digitális képelemző algoritmus a rafton belüli és rafton kívüli receptor, illetve specifikus foszfotirozin-sűrűség meghatározására. 5.7.3. Digitális képelemző algoritmus a rafton belüli és rafton kívüli átlagos specifiku receptorfoszforiláltság meghatározására. 	26 us 28
6	 5.8. A foszfotirozin reziduumok és a jelátvítel végpontjainak vizsgálata Western blot módszerrel	29 30 31 32
	 6.1. A PDGFR β lipid-tutaj- és konfluenciafüggő szabályozása glioblasztóma sejtvonalakon 6.1.1. A PDGFR β klaszteres eloszlást mutat és jelentős részben lipid-tutajokban lokalizálódik	32 32
	 6.1.2. A PDGFR β relatív specifikus foszforiláltsága függ a sejtkonfluenciától és a receptorok lipid-tutaj lokalizációjától 6.1.4. A Ras-MAPK útvonal aktivitása és a következményes sejtproliferáció ritka kultúrákban dominál 	37 41
	 6.1.5. A PLCγ útvonal aktivitása és a következményes sejtmigráció konfluens kultúrákban dominál 6.2. Di time h (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	46
	 6.2. Platına alapú kemoterápiás szerek és a TRAIL raftfüggő szinergizmusa a DR4 és DR5 mediált, kaszpáz-8 dependens apoptózis indukciójában 6.2.1. A TRAIL receptorok a sejtfelszínen klaszteres elrendeződést mutatnak és 	50
	jelentős részben átfednek a lipid-tutajokkal	50

6	.2.2.	A platinaszármazékok fokozzák a TRAIL receptorok expressziós szintjét a	51
6	23	A DR4 és DR5 receptorok lipid-tutai lokalizációja nő a platina származákokka	31 1
0.2.3.		történt kezeléseket követően	1 52
6	.2.4.	A DR4 és DR5 receptorok lipid-tutaj lokalizációját rövid időtartamú TRAIL	
		kezelés fokozza	54
6	.2.5.	Az LA-12-vagy a ciszplatin által közvetített TRAIL-indukált citotoxicitás az	
		apoptótikus kaszpáz kaszkád aktiválásán keresztül valósul meg	55
7.	Követ	keztetések	57
7.1.	A P	DGFR β lipid-tutaj- és konfluenciafüggő szabályozása glioblasztóma	
	sejt	vonalakon	57
7.2.	Plat	ina alapú kemoterápiás szerek és a TRAIL raftfüggő szinergizmusa a DR4 és	
	DR:	5 mediált, kaszpáz-8 dependens apoptózis indukciójában	59
8.	Össze	foglalás	62
9.	Summ	nary	63
10.	Refere	enciák	64
11.	Publik	sációk	71
11.1	l. Köz	lemények	71
11.2	2. Az (értekezés témájához kapcsolódó előadások, pályamunkák és poszterek	73
1	1.2.1.	Elsőszerzős helyi TDK előadások:	73
1	1.2.2.	Elsőszerzős országos TDK előadások:	73
1	1.2.3.	Elsőszerzős pályamunkák:	73
1	1.2.4.	Magyar nyelvű elsőszerzős előadások:	73
1	1.2.5.	Magyar nyelvű elsőszerzős poszterek:	74
1	1.2.6.	Idegen nyelvű elsőszerzős poszterek:	74
12.	Köszö	onetnyilvänitäs	15
13.	Az ért	tekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	76

1. Rövidítések jegyzéke

DAG	diacilglicerol
DcR1	TRAIL-R3/decoy receptor 1
DcR2	TRAIL-R4 / decoy receptor 4
DD	death domain / sejthalál domén
DISC	death-inducing signaling complex /
	sejthalál indukáló szignálkomplex
DR4	TRAIL-R1/death receptor #4 / halálligand receptor #1
DR5	TRAIL-R2 / death receptor #5 / halálligand receptor #2
GM1	monosialotetrahexozilgangliozidban
GPI	glikozil-foszfatidilinozitol
GRB2	Growth factor receptor binding protein-2
IP3	inozitol (1,4,5)-triszfoszfát
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor/
	trombocita eredetű növekedési faktor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor / trombocita eredetű
	növekedési faktor receptora
PI3-kináz	foszfatidilinozitol 3-kináz
ΡLCγ	foszfolipáz Cy1
PtdIns(3,4,5)-P3	foszfatidilinozitol (3,4,5)-triszfoszfát
PtdIns(4,5)-P2	foszfatidilinozitol (4,5)-biszfoszfát
PTP1B	protein-tirozin-foszfatáz 1B
RasGAP	Ras GTPáz aktivátor protein

SH2 domén	Src homológia #2 domén
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R5	szolubilis osteoprotegerin
Tyr1021	Tirozin 1021-es aminosav
Tyr716	Tirozin 716-os aminosav
Tyr751	Tirozin 751-es aminosav
Tyr771	Tirozin 771-es aminosav
Tyr857	Tirozin 857-es aminosav

2. Bevezetés

Az irodalomban számos publikáció mutat rá arra, hogy a sejtmembrán monosialotetrahexozil-gangliozidban (GM1) gazdag területei – melyek azonosíthatók az úgynevezett lipid raftokkal, vagy lipid-tutajokkal – fontos szervező-moduláló szerepet játszanak a különböző kimenetelű jelátviteli útvonalak szabályozásában. A citoplazmamembrán ezen koleszterinben és szfingolipidekben gazdag, szubmikron méretű strukturális egységeinek tehát nem pusztán morfológiai, hanem funkcionális szerepe van. A raftok képesek egymástól szigetszerűen elkülönítve akkumulálni a különböző sejtélettani folyamatokban együttműködő membránfehérjéket, így biztosítva az eltérő kimenetelű jelátviteli kaszkádok hatékony lejátszódását. Ezek a lipid domének, mint membránon úszó "forró területek" egy kis átmérőjű – 50-150 nm – területre képesek koncentrálni a receptorokat és más járulékos fehérjéket, ami egy sokkal hatékonyabb és intenzívebb lefolyású jelátvitelhez vezet. Dolgozatomban szeretnék képet adni a membrán GM1 gangliozidban gazdag mikrodoménjeinek szervező és moduláló funkciójáról néhány tumor sejtvonal, és azokat célzó molekuláris terápiák esetében.

Kísérleteimben megvizsgáltam a tirozinkináz aktivitású PDGF receptorok (PDGFR) β típusának lipid-tutaj- és konfluenciafüggő szabályozását, továbbá feltártam a ciszplatin és egy új, még nem törzskönyvezett, igen hatékony platina alapú gyógyszerjelölt és a TRAIL halálligand raftfüggő szinergizmusát a DR4 és DR5 mediált, kaszpáz-8 dependens apoptózis indukciójában.

Megállapítottam, hogy a sejtmembrán GM1 gazdag doménjei minden vizsgált rendszerben fontos szervezői a különböző útvonalakon lejátszódó jelátviteli folyamatoknak, és így nélkülözhetetlenek a vizsgált sejtfunkciók optimális működtetésében.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A lipid-tutajok

A membránok szerkezetének leírására számos elmélet született, ezek közül évtizedekig a legelfogadottabb az 1972-ben leírt Singer és Nicolson féle folyadék mozaik modell volt (1), amely a lipid kettősréteget olyan kétdimenziós folyadéknak tekinti, amelyben a beágyazott membránfehérjék laterálisan szabadon diffundálnak. A modell értelmében a membránt amfipatikus lipid molekulák kettős rétege alkotja. A két réteget a lipidek hidrofób zsírsavláncai kapcsolják egymáshoz, míg a poláros hidrofil csoportok (fej) a membrán külső felszínén helyezkednek el. A lipid kettősrétegbe kisebb-nagyobb mértékben fehérjemolekulák süllyednek, amelyek közül egyesek teljesen átérik a membránt, kapcsolatot teremtve az intraés extracelluláris tér között. Ezeket integráns fehérjéknek nevezzük, melyek nem távolíthatók el a kettősrétegből a membránszerkezet megbomlása nélkül. A lipidek szabadabb oldalirányú elmozdulása bizonyos mértékű folyékonyságot, a fehérjemolekulák mozaikos elrendeződése és egymáshoz való kapcsolódása pedig stabilitást biztosít a membránnak. A folyadék mozaik modell az elektronspin-rezonancia módszerével szintetikus lipid kettősrétegekben mérte az egyedi lipidmolekulák mozgását. A mérések szerint két szomszédos lipid molekula laterális diffúziója gyakran, másodpercenként 10⁷ –szer, míg a két lipid réteg közötti molekuláris átjárás (flip-flop) spontán ritkán, kb. havonta egyszer következik be. Hasonló méréseket végeztek izolált membránokon és egyszerű intakt sejteken (mikoplazmák, baktériumok és vörösvértestek) is. Ezen kísérletek ugyanolyan eredményekre vezettek, mint a szintetikus membránokon végzett vizsgálatok. Élő sejtek membránjában az újonnan szintetizált lipid molekulák a membrán citoplazmatikus, azaz belső részébe épülnek be, ami látszólag nem engedi a membrán felületének szabad növekedését, hiszen a lipidek kis valószínűséggel fordulnak át az egyik membránrétegből a másikba. Valójában a sejtmembrán felülete folyamatosan változik a sejt aktuális szükségleteinek függvényében. A megoldást a foszfolipid transzlokátor (flippáz) enzimek jelentik, amelyek képesek átjuttatni a lipidek egy részét a külső rétegbe. Fontos megemlíteni, hogy a biológiai membránok laterális inhomogenitásának fogalma már a 70-es években felvetődött, de a Singer-Nicolson féle modellnek nem vált részévé (2). Bár a folyadék mozaik modell kidolgozása nagy előrelépést jelentett a membránstruktúra leírásában, számos újonnan felvetődő funkcionális kérdésre nem adott választ.

A 80-as évek elejére számos új megfigyelés és eredmény mutatott rá arra, hogy a biológiai membránok nem pusztán véletlenszerűen elrendeződő folyékony lipid kettősrétegek, amelyekben perifériás és integráns fehérjék nagy tömege szabadon diffundál, hanem olyan hierarchikusan felépülő sejtalkotók, melyek összetételét és fizikai tulajdonságait a laterális heterogenitás befolyásolja (*3*). Az új elméletek szerint az élő dinamikus membrán nem egységes, azaz különböző területei ugyanazon pillanatban más és más permeabilitási, mozgékonysági, folyékonysági, vastagsági és összetételi állapotban lehetnek, amely tulajdonságok külső vagy belső jelek hatására folyamatosan változnak. Ezek a jelenségek a lipidek korábban nem ismert óriási kémiai diverzitásából és azok membránbeli klaszterizációjából vezethetők le. A plazmamembránt felépítő lipidek és fehérjék magas fokú lokális rendezettsége, illetve a molekulák közötti kommunikáció arra utal, hogy a sejtmembránok egyedi szubmikronos mintázata nélkülözhetetlen lehet számos sejtfunkció optimális működtetéséhez (*4, 5*).

1997-ben Simons és Ikonen új elméletében (6) a membránban olyan szfingomielinből, glikolipidekből, koleszterinből és GPI-horgonyzott fehérjékből felépülő rendezett struktúrákat írt le, amelyek a folyékony kettősrétegben diffundálnak. Ezeket a szervezett membrán doméneket nevezték el lipid raftoknak, vagy más névvel detergens rezisztens membrán doméneknek (DRM), magyarul lipid-tutajoknak (1. ábra). A raftok felépítésének

középpontjában a koleszterin áll, ami gyűrűs szerkezetével biztosítja azok rendezett struktúráját. Emellett a tutajok exoplazmatikusan szfingolipideket, endoplazmatikusan telített foszfolipideket tartalmaznak, melyek membránproteinekhez horgonyzott acillánca fokozza a stabilitást. Az új modell a plazmamembránt olyan rendezetlen lipidekből álló "tengernek" tekinti, amelyben a koleszterinből, telített lipidekből, szfingolipidekből és proteinekből álló rendezett struktúrák, azaz a "tutajok" többé-kevésbé szabadon úsznak. Bár a tutajok felépítésében résztvevő kulcsmolekulák zöme a sejt endoplazmatikus retikulumában szintetizálódik (koleszterin és bizonyos szfingolipid egységek), emlős sejtekben intakt raftok először a Golgi-komplexben figyelhetők meg (7). 1997 óta a raft hipotézis népszerűvé vált a kutatók körében, több ezer publikáció jelent meg az elmélet alapján a legkülönbözőbb szakmai folyóiratokban. Fontos kiemelni, hogy bár a lipid-tutajokra alapozott membránmodell széles körben elfogadott, számos a rendszerrel kapcsolatos sejtbiofizikai jelenség még pontosításra vár.



1. ábra: A sejtmembrán lipid kettősrétege

A raft hipotézis kidolgozását követő időszak kutatásai világítottak rá arra a lehetőségre, hogy a lipid-tutajok nem pusztán strukturális egységek a sejtmembránban, hanem jelenlétük funkcionális következményekkel is járhat. Ezt alátámasztja az a tény, hogy a lipid kettősrétegbe GPI-horgonyzott és transzmembrán proteinek vannak beágyazva (8-10),

könnyen elképzelhető, hogy ezek működését és interakcióit a klaszteres szerveződés befolyásolhatja. Erre utalnak azok a vizsgálatok is, melyek megállapították, hogy a sejtek jelátviteli folyamataiban fontos szereppel bíró fehérjék megemelkedett koncentrációban találhatóak meg a lipid-tutajokban. Ilyen fehérjék például az Lck tirozinkináz (11), a Src családbeli kinázok (12), és egyes G fehérjék (13), továbbá integrinek (14).

Az elmúlt évtized eredményei világítottak rá arra, hogy a lipid-raft mediált laterális rendezettség eredményeként a membránban meghatározott fehérjemintázat jön létre. A lipid-tutajok egyrészt képesek platformot képezni a tutajhoz kihorganyozott fehérjéknek a hatékony kölcsönhatáshoz, más molekulákat viszont kirekesztenek az interakcióból (*15*). Egy specifikus membránfehérjét a célszekvenciája irányít a sejthártya rendezett vagy rendezetlen fázisába (*16*). Például azok a transzmembrán fehérjék, amelyek hosszabb transzmembrán doménnel rendelkeznek, nagy valószínűséggel a membrán vastagabb, rendezett struktúráihoz kapcsolódnak, ezzel is minimalizálva a hidrofób részek pontatlan illesztésére fordítandó energiát.

A lipidek és fehérjék kölcsönhatásának fontos következménye, hogy a raftok struktúráját és ezzel funkcióját a külső környezetből származó ingerek is képesek befolyásolni. Megfigyelték azt is, hogy stimulációt követően a kisebb lipid-tutajok könnyen nagyobb egységekké olvadnak össze. A reakciót számos raft asszociált fehérje kihorgonyzódása kíséri, ami fokozza a lipid-tutaj és a citoszkeleton közötti kölcsönhatás erősségét (*17*). A fent leírt megfigyelések alapján a korábban leírt, rendezett és rendezetlen struktúrákat feltételező raft hipotézis kiegészült a dinamikus átalakulás lehetőségével (*18*). A dinamikusan strukturált mozaik modellben a fehérje – fehérje, illetve a fehérje - lipid kölcsönhatásoknak legalább akkora szerepe van, mint a rendezett vagy rendezetlen formában megjelenő lipidek egymás közötti kölcsönhatásainak. A raftokban megvalósuló fehérje - lipid interakciók növelik a jelátviteli folyamatokhoz kapcsolódó intermolekuláris kölcsönhatások

élettartamát, továbbá lehetővé teszik a sejtfelszíni receptorfehérjék kapcsolódását a kortikális aktin citoszkeletonhoz, illetve egyéb citoplazmatikus adaptor- és szignál proteinekhez (19), ugyanakkor egyes fehérjéket el is választhatnak egymástól.

A mikroszkópos technika és az immunfluoreszcenciás jelölés területén bekövetkező fejlődés lehetővé tette a lipid-raftok struktúrájának és funkciójának pontosabb megfigyelését (20). A legújabb eredmények szerint a membrán mikrodomének mérete a néhány nanométeres lipidgyűrűktől (21) a száz nanométernél kisebb tartományba eső szigeteken át (22) a néhányszáz nanométeres klaszterekig változhat (23). Néhány esetben a nagyobb domének csak a kisebb raft egységek mesterséges összekapcsolását követően lesznek azonosíthatóak a nyugvó sejtek membránjában (24), máskor a nyugvó sejtek felszínén is kimutathatóak a szubmikronos tartományba eső foltok, amelyek összetételüket tekintve lipid-tutajként azonosíthatóak (20). Bár a különböző méretű membrán mikrodomének lipid összetételüket tekintve nagy változatosságot mutatnak, a magas glikoszfingolipid és koleszterin tartalom általánosan jellemző.

Az egyik legkorábbi marker, amit a lipid-tutajok mikroszkópos azonosítására használtak, a domének GM1 gangliozid komponenséhez direkten kapcsolódó koleratoxin B alegysége volt (25).

3.2. A lipid-tutajok szerepének vizsgálatában felhasznált molekuláris modellrendszerek

3.2.1. A PDGF receptor

Az elmúlt évtized tudományos irodalmában számos publikáció jelent meg a trombocita eredetű növekedési faktor (Platelet-Derived Growth Factor / PDGF) patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepével és a rá specifikus receptorok jelátvitelével

kapcsolatban. A PDGF jelentős élettani szereppel bír a kötőszöveti sejtek migrációs aktivitásának és proliferációjának szabályozásában, továbbá az embrionális fejlődés, illetve a sebgyógyulás kontrollált lejátszódásában (26). Másrészről, nagyszámú betegség ismert az irodalomban, amely valamilyen módon kapcsolatba hozható a PDGF, illetve receptora kóros expressziójával, és jelátvitelével. Jelenleg is több kutatás foglalkozik azzal, hogy a PDGF ligandot, vagy annak receptorát mint lehetséges támadáspontot használja fel különböző rosszindulatú proliferatív megbetegedések terápiájában (27).

A PDGF-et, mint szolubilis növekedési faktort először az 1970-es években mutatták ki a vérlemezkék alfa granulumaiból. Már a legelső publikációk leírták, hogy a ligand nélkülözhetetlen a fibroblasztok, simaizom-, illetve glia sejtek normális működéséhez (28); (29). Az 1980-as években megalkotott első hipotézis a PDGF molekuláris szerkezetét két különböző – A, illetve B – polipeptid lánc által alkotott heterodimerként írta le (30). Később sikerült kimutatni mind a PDGF-AA, mind a PDGF-BB homodimereket különböző szövetkultúrákból és ennek megfelelően a szerkezetre vonatkozóan új hipotézis született. Ennek értelmében a PDGF növekedési faktor családot két gén – PDGF-A, illetve PDGF-B – által kódoltan három fehérje – PDGF-AA, PDGF-BB, illetve PDGF-AB – alkotja (26). Az új évezred első évtizedében további variánsokat – a PDGF-C-t (31), és a PDGF-D-t (32) – fedeztek fel.

Heldin elmélete értelmében az A és B alegységek kovalens kapcsolataként leírt PDGF dimer hasonló dimer szerkezetű α és β láncokból felépülő PDGF receptorhoz kötődik (*33*). A β -típusú receptorhoz kizárólag a ligand B alegysége tud kapcsolódni, míg a receptor α -típusa egyaránt képes kötni a PDGF A és B alegységét. A ligandhoz hasonlóan a receptorok is képesek mind homo, mind heterodimer kialakítására. Érdekes megfigyelés, hogy az α és β típusú homodimer szerkezetű receptorok kevésbé hatásos stimulátorai a mitogenezisnek, mint az α/β heterodimer szerkezetűek. Ennek az oka összefügg azzal a felismeréssel, hogy a α/β típusú PDGF receptorok nem képesek megkötni a Ras GTPáz aktivátor proteint (RasGAP), ami a Ras GTPáz negatív regulátora. A kapcsolat hiánya a Ras fehérjék által aktivált mitogénaktivált protein kináz (Ras-MAPK) útvonal megemelkedett aktivitásához, így a proliferációs és más mitogén szignálok felerősödéséhez, végeredményben kontrollálatlan sejtproliferációhoz vezet (34). A PDGF-CC és PDGF-DD ligandok a receptor $\alpha\alpha$, illetve $\beta\beta$ homodimer formájához kapcsolódnak számottevő affinitással (31). Az α-típusú PDGF receptorok nagy fokban expresszálódnak a mezenchimális sejtek, főleg a chondrociták (35), valamint az oligodendrociták (36) felszínén, míg a β-típusú PDGF receptorok megtalálhatóak a vaszkuláris simaizom-sejteken (37), illetve nagy jelentőséggel bírnak az glia eredetű idegrendszeri tumorok szabályozásában (38, 39). Utóbbiak esetében a PDGF receptor expressziója jól korrelál a tumor grádusával, proliferációs aktivitásával, azaz a malignitás fokával (40).

Ezen daganatok közül felnőttkorban leggyakoribb a glioblasztóma multiforme, mely rendkívül nagy malignitású, rossz prognózisú primer idegrendszeri tumor. Nagyon variábilis és közel kétszer olyan gyors növekedésre képes, mint az eggyel alacsonyabb grádusba sorolt anaplasztikus asztrocitóma. Terápia nélkül a diagnózis felállítása utáni 3 hónapon belül a betegek 95%-ának halálához vezet, de kombinált műtéti, radio- és kemoterápia alkalmazásával sem haladja meg az egy évet a várható túlélési idő. A tumor rendkívüli malignitása miatt a PDGF/PDGFR mediált tumor proliferáció jelátviteli útvonalainak felderítése nagy jelentőséggel bírhat.

A PDGF ligand megkötését követően a receptorok dimerizálódnak és a szerkezetváltozás hatására aktiválódó intrinsic tirozinkinázuk segítségével transz-foszforilálják egymást regulatórikus, 857-es tirozinjukon. Ezt követően kaszkádszerűen foszforilálódnak a receptor további intracelluláris tirozinjai, melyek a szignáltranszdukcióban kulcsszereppel bíró Src homology 2 (SH2) és foszfotirozin-kötő doménnel rendelkező

fehérjéknek biztosítanak kapcsolódási pontot (26). A korábban említett 857-es tirozin reziduum (Tyr857) kiemelkedő jelentőséggel bír, hiszen önmagában képes a receptor tirozinkináz katalitikus aktivitását szabályozni (41). Ennek az aminosavnak a mutációja a receptor aktivitásának súlyos csökkenéséhez és az autofoszforilációs kaszkád elmaradáshoz vezet (42). A receptor 15 intracelluláris tirozinja közül 11 esetében figyelték meg, hogy a ligandkötést követő Tyr857 mediált aktiváció során képesek foszforilálódni. Talán a legfontosabb közülük a 716-os tirozin (Tyr716), mely foszorilálódását követően képes megkötni az SH2 doménnel rendelkező növekedési faktor receptort kötő protein 2-t (growth factor receptor binding protein-2/GRB2), mely a sejtek proliferációs aktivitását fokozó Ras-MAPK útvonal megindításához szükséges (43). A Tyr716 specifikus defoszforilálása a protein-tirozin-foszfatáz 1B (PTP1B/PTPN1) által a PDGF indukált MAPK aktivációt gátolja (44). A PDGF receptor intracelluláris, 771-es tirozinja (Tyr771) foszforilálódását követően kötőhelyként szolgál a már korábban említett Ras-GAP számára, így a Ras-MAPK útvonalat gátolja (45). A Tyr771 foszforiláltsági állapotát az SHP-2 (PTPN11) tirozin-foszfatáz szabályozza. Azokon a mutáns PDGF receptorokon, melyek SHP-2 foszfatáz kötőhelye elveszett vagy működésképtelenné vált jóval nagyobb mértékű Tyr771 foszoriláltság mérhető PDGF ligandstimulációt követően (46). A 751-es tirozin (Tyr751) a receptor kináz-inzert régiójában helyezkedik el és foszforilációját követően a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3-kináz) p85-ös szabályozó alegységét képes megkötni (47). A PI3-kináz katalizálja a membránhoz asszociált foszfatidilinozitol (4,5)-biszfoszfát (PtdIns(4,5)-P2) foszfatidilinozitol (3,4,5)triszfoszfáttá (PtdIns(3,4,5)-P3) alakulását. A PDGF stimulációt követően indukált PI3-kináz aktiválja a DNS szintézist szabályozó és az apoptózist gátló Akt kinázt (48). A Tyr716-hoz hasonlóan a PTP1B/PTPN1 protein foszfatáz képes defoszforilálni a Tyr751-et is, ami drasztikusan csökkenti az Akt kináz aktiváltsági állapotát (44). A sejtek túlélésének Akt közvetítette szabályozásán túl a PI3-kináz szignáltranszdukciós útvonal fontos szerepet játszik a sejtmigráció irányításában is. A PDGF receptor 1021-es tirozin reziduuma (Tyr1021) a foszfolipáz Cγ1 (PLCγ) SH2 doménjének a kötőhelye (49). A PLCγ katalizálja a PtdIns(4,5)-P2 hidrolízisét az intracelluláris kalcium mobilizációban szerepet játszó inozitol (1,4,5)triszfoszfáttá (IP3) és a protein-kináz-C-t aktiváló diacilglicerollá (DAG) (50). A PLCγ részt vesz a sejtmigráció szabályozásában (51) például a RhoA fehérje foszforilálásán keresztül (52) (2. *ábra*).





A receptorok Tyr1021-es reziduumain foszforilálása aktiválja a foszfolipáz C γ -t, ami a membránban, annak alkotóelemeként található foszfatidilinozitol (4,5)-biszfoszfátot (PtdIns(4,5)-P2) bontja inozitol-triszfoszfáttá (IP3) és diacilglicerollá (DAG). Az IP3 a sejtben található kalcium raktárakból kalciumot szabadít fel; az IP3 koncentrációjának növekedése az intracelluláris kalcium koncentráció átmeneti növekedésével jár. A receptor Tyr751-es aminosavának foszforilálása a foszfatidilinozitol 3-kináz útvonalat iniciálja, amely az Akt kinázok aktiválásán keresztül a sejtek túlélését segíti elő. A Tyr716-os foszforilációja a Ras-MAPK útvonalon keresztül sejtproliferációhoz vezet.

Normális körülmények között a sejtek növekedését és migrációs tulajdonságát nem csak a növekedési faktorok és azok receptorai szabályozzák, hanem számos pozitív és negatív stimulus is befolyásolja a kialakuló sejtválaszt. Ezek a módosító hatások elsősorban az extracelluláris mátrix, illetve a szomszédosan elhelyezkedő sejtek felől érkeznek. A sejt-sejt kapcsolatok növekvő száma a sejtek migrációs és proliferációs aktivitásának csökkenéséhez, azaz kontakt gátláshoz vezet (*53*). Amikor a normál sejtek tumorsejtekké dedifferenciálódnak,

elveszítik érzékenységüket a környezetből érkező jelekre, így nem valósul meg a negatív reguláció, ami kontrollálatlan proliferációhoz és migrációhoz vezet (54). A PDGF receptor esetében leírták, hogy a kontakt gátlás megvalósításában a nektin fehérjecsalád és különböző protein tirozin-foszfatázok vesznek részt (55).

Munkacsoportunk korábbi kísérleteiben megállapította, hogy glioblasztóma sejtkultúrák közül csak a konfluens, vélhetően kontakt gátlás alatt lévők válaszolnak PDGF stimulusra komplett, kétfázisú kalcium tranzienssel (56). A jelenség hátterében a konfluens sejtek felszínén fokozottabb PDGF receptor expressziót mutattunk ki. Azt is megállapítottuk, hogy a receptorok a sejtfelszínen szubmikron méretű klaszteres eloszlást követnek. A receptorklaszterek átfedést mutatnak GM1 gangliozidban gazdag lipid-tutajokkal, a tutajok koleszterin tartalmának csökkentése metil-β-ciklodextrinnel a klaszterek határait elmossa, az átfedést és a receptorok aktiválhatóságát pedig csökkenti. A sejtkultúra konfluenciájának növekedésével mind a klaszterek száma, mind azok receptorsűrűsége nő.

3.2.2. A TRAIL receptor

Napjainkban a daganatellenes terápiák legfontosabb célja, hogy szelektíven indukáljanak apoptózist a malignus sejtekben úgy, hogy ezzel párhuzamosan az egészséges sejtekre nem hatnak. Az egyik ígéretes megközelítés az extrinsic apoptótikus útvonalak indukálása a tumor nekrózis faktor szupercsaládba tartózó TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) liganddal, ami szelektíven indítja be a daganatsejtek programozott halálát mind *in vitro*, mind *in vivo* (57, 58). A daganatos sejtek érzékenységének és a normál sejtek rezisztenciájának a pontos mechanizmusa még nem ismert. Mind a sejtmembrán, mind az intracelluláris fehérjék szintjén számos lehetséges útvonal létezhet, ami a normál szövetekben, illetve bizonyos daganatokban TRAIL rezisztenciához vezet. Malignus sejtekben valószínűleg az apoptótikus útvonalak károsodása vagy a sejtek túlélését segítő útvonalak fokozott aktivitása vezet a rezisztencia kialakulásához

(59-61). A rezisztenciához vezető molekuláris mechanizmusok vizsgálata nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a citokint biztonságosan lehessen alkalmazni tumorellenes szerként.

A TRAIL ligand receptorának öt típusa ismert. A death receptor 4 (DR4 vagy TRAIL-R1) és a death receptor 5 (DR5 vagy TRAIL-R2) halál ligand receptorok tartalmazzák az úgynevezett sejthalál domént (death domain, vagy DD), amely az apoptótikus szignál továbbításáért felelős. A receptor három másik típusa álreceptor, sem a decoy receptor 1 (DcR1 vagy TRAIL-R3), sem a decoy receptor 2 (DcR2 vagy TRAIL-R4), sem a szolubilis osteoprotegerin (TRAIL-R5) nem képes programozott sejthalál elindítására. Fontos kiemelni, hogy a TRAIL receptorok sejtfelszíni expressziója nem mindig korrelál a kiváltott apoptótikus válasz mértékével. Számos helyen publikálták azt az érdekes megfigyelést, hogy néhány daganatsejt felszínén megtalálható mindkét valódi receptor, de sejthalált eredményező szignál preferáltan vagy csak a DR4 (pl.: limfoid leukémia) (62), vagy csak a DR5 típusról (pl.: vastagbél rák) (63) indul. Leírták továbbá, hogy az álreceptorok magasabb fokban expresszálódnak a normál sejtek felszínén, azonban ez a hatás nem szövetspecifikus és nem minden esetben elegendő a TRAIL mediált apoptózis kivédéséhez (64, 65).

A DR4 és DR5 sejthalál receptorok egy Fas-asszociált haláldomén fehérje (FADD) és a pro-kaszpáz-8 részvételével kialakuló sejthalál indukáló szignálkomplexet (death-inducing signaling complex vagy DISC) hoznak létre, ami mediálja a TRAIL indukált apoptózist *(3. ábra).* A DISC-ben aktivált kaszpáz-8 mennyisége korrelál az apoptótikus válasz progressziójával. Az úgynevezett I-es típusú sejtekben a bőségesen aktivált kaszpáz-8 közvetlenül hasítja és aktiválja az effektor kaszpázokat, ami sejthalálhoz vezet. A II-es típusú sejtekben a DISC-ben aktivált kaszpáz-8 aktivációja nem elegendő az effektor kaszpázok indukciójához, ezért az apoptótikus válasz ezekben a sejtekben a mitokondriális útvonalon indul be (*66, 67*).



3. ábra: A TRAIL receptor mediált jelátviteli utak

A TRAIL ligand két receptorán keresztül (DR4 és DR5 vagy TRAIL-R1 és TRAIL-R2) képes a sejtek apoptózisához vezető jelátviteli útvonalakat iniciálni. A legfontosabb iniciátor kaszpáz a kaszpáz-8. A TRAIL receptorok emellett aktiválják az NFκB aktivációs kaszkádot a TRAF2-NIK-IKK, és a JNK-kinázokat a TRAF2-MEKK1-MKK4 útvonalon (*68*).

Az irodalomban számos hivatkozás található a TRAIL-hez kapcsolt jelátvitel kezdeti lépéseivel, különösen a TRAIL receptor expressziójának szabályozásával, ezek sejtfelszíni eloszlásával, transzlokációjával, membrán lipid-tutaj (ko)lokalizációjával és internalizációjával kapcsolatban. A legújabb kutatások világítottak rá arra, hogy a lipid-raftok mint szubmikron méretű platformok vesznek rész a DR-mediált apoptózisban (69). A TRAIL receptorok akkumulációja a membrán GM1 gazdag lipid-tutajaiban elősegíti a DISC kialakulását és így fokozza a kaszpáz-8 aktivációját, ami sejtek apoptózisához vezetett. Megfigyelték, hogy a TRAIL-DISC rafton kívüli felhalmozódása gátolta a kaszpáz-8 hasítást és anti-apoptótikus szignál kialakulásához vezet (69). TRAIL ligandstimulust követően a receptorok membránbeli eloszlásának döntő hatása van mind a sejtek érzékenységére, mind azok rezisztenciájára (70).

Számos daganat esetén megfigyelték, hogy a különböző kombinációs kemoterápiák TRAIL rezisztencia kialakulásához vezetnek. Különböző molekuláris mechanizmusok ismertek, amelyek szinergisztikus hatásukkal a célsejtek apoptózisához vezetnek. A kemoterápiás szerek döntően befolyásolják a TRAIL indukált sejtválasz kezdeti lépéseit, például a receptorok sejtfelszíni expressziójának fokozásával (71), azok lipid-tutajokba gyűjtésével (72, 73), a DISC kialakításával és a társult kaszpáz-8 aktivációval (74), illetve a proapoptótikus/apoptótikus molekulák fel- és leszabályozásával (75). A különböző hatások részvétele az összegzett válaszban függ a sejtek (I-es, illetve II-es), és a kemoterápiás szer típusától.

A különböző platina komplexek (például ciszplatin, carboplatin és oxaliplatin) széleskörűen alkalmazott kemoterápiás szerek a szolid tumorok kezelésében. Azáltal, hogy kovalens kötéseket képeznek a DNS kettős hélixszel, indukálják a DNS károsodást jelző szignált, ami megállítja a sejtciklust, emellett a platinaszármazékok képesek azonnal aktiválni az apoptózis intrinsic mitokondriális útvonalát is, így pusztítva el a malignus sejteket. A vegyületek alkalmazása ugyanakkor korlátozott a súlyos mellékhatások és/vagy a rezisztencia kialakulása miatt. Az elmúlt két évtizedben számos újonnan szintetizált platinavegyület jelent meg a klinikai vizsgálatokban, a legfontosabbak a Pt(IV) komplexek voltak. A kísérleteinkben használt LA-12 is egy új típusú Pt(IV) adamantylamin ligandot tartalmazó komplex, ami jelenleg első fázisú klinikai kipróbálás alatt áll. Az LA-12 lassítja a sejtciklust és apoptózist indukál számos vizsgált daganatsejtben (76, 77). *In vivo* kísérletekben az LA-12 daganatellenes aktivitása jóval magasabb mind a ciszplatinnal, mind a satraplatinnal, egy másik Pt(IV) komplexszel összevetve, továbbá nagyobb mértékben penetrál a szövetekbe és kevésbé toxikus a szervezetre (78).

4. Célkitűzések

Munkánk során a lipid-tutajok szerepét vizsgáltuk meg a tumorok kifejlődésének és progressziójának, illetve a tumorsejtek programozott sejthalálának vonatkozásában.

Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Van-e szerepe a lipid-tutajoknak és a sejtkonfluenciának a PDGF receptor
 (PDGFR) β típusának szabályozásában?
- Van-e szerepe a lipid-tutajoknak a platinaszármazékokkal és TRAIL receptorokon keresztül kombináltan előidézett apoptótikus válasz kialakulásában?

5. Anyagok, módszerek

5.1. Anyagok, törzsoldatok

- HEPES puffer: 20 mM HEPES (Fluka, N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2etánszulfonsav); pH 7,2 ; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM CaCl2; 1,5 mM MgSO4;
 5 mM Na-piruvát desztillált vízben oldva, 4°C-n tárolva. Felhasználás előtt 10 mM végkoncentrációjú glükózzal egészítettük ki a puffert.
- 2. TBS puffer: 50 mM Tris (trisz(hidroximetil)-aminometán) 150 mM NaCl desztillált vízben oldva, 4°C-n tárolva
- 3. DMEM tápoldat (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4°C-n tárolva.
- 4. RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), 4°C-n tárolva
- 5. McCoy's 5a módosított tápoldat, 4°C-n tárolva
- 6. FCS (fetal calf serum = foetális borjú szérum), -20°C-n tárolva.
- TE-oldat: EDTA (etiléndiamin-N,N,N',N'-tetraacetát) 1 mM-os oldata PBS-ben, 0,05% (w/v) tripszinnel, -20°C-n tárolva.
- PDGF: 5 μg/ml rekombináns PDGF BB homodimer; 10 mM ammónium acetátot;
 140 mM NaCl-t; 2,5% BSA-t tartalmazó oldatban; pH 6,0; -20°C-n tárolva.
- RD lízis puffer: 20 mM Tris; 0,1% NP 40; 137 mM NaCl; 10% glicerol, 2 mM EDTA desztillált vízben oldva, 4°C-n tárolva
- Elektroforézis puffer (10x): 30 g Tris; 144 g glicin; 100ml 10%-os SDS desztillált vízzel 1000 ml végső térfogatra hígítva, szobahőmérsékleten tárolva
- 11. 30% Akrilamid (Acrilamide/bis-Acrilamide) 4°C-n tárolva
- 12. Mintapuffer (6x): 3 ml 1 M Tris; 1,2 g SDS; 3 ml glicerol; 2 mg brómfenolkék; 0,39 g DTT desztillált vízzel 10 ml végső térfogatra hígítva, -20°C-n tárolva
- 13. Nátrium-ortovanadát (NaoV) 100 mM-os törzsoldatban -20°C-n tárolva
- 14. DTT (Dithiothreitol) por 4°C-n tárolva

- Fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) (Sigma) 200 mM HEPES-t tartalmazó oldatban;
 pH 6,0; -20°C-n tárolva
- Proteáz inhibitor koktél (Protease Inhibitory Cocktail; Roche) tablettaként 4°C-n tárolva, használat előtt 1,5 ml steril vízben feloldva
- 17. Anti-PDGFR(β) antitest (R&D Systems): a PDGF receptor β típusa elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 1 mg/ml-es törzsoldatban, -70°C-n tárolva.
- Anti-foszfo-PDGFR β pospho-Tyr716 (Santa-Cruz Biotechnology): a PDGF receptor β intracelluláris foszfo-Tyr716 típusa elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 0,2 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- Anti-foszfo-PDGFR β pospho-Tyr771 (Santa-Cruz Biotechnology): a PDGF receptor β intracelluláris foszfo-Tyr771 típusa elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 0,2 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- 20. Anti-foszfo-PDGFR β pospho-Tyr751 (Santa-Cruz Biotechnology): a PDGF receptor β intracelluláris foszfo-Tyr751 típusa elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 0,2 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- 21. Anti-foszfo-PDGFR β pospho-Tyr1021 (Santa-Cruz Biotechnology): a PDGF receptor β intracelluláris foszfo-Tyr1021 típusa elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 0,2 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- 22. Anti-foszfo-Akt (Millipore): az intracelluláris foszfo-Akt (Ser473) elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 0,2 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva
- Anti-foszfo-p38, illetve p42/44 MAPK (Cell Signaling): az intracelluláris foszfo-p38 (Tyr180/Tyr182), illetve foszfo-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204) elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 1 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva
- 24. Anti-foszfo-RhoA (Santa-Cruz Biotechnology): az intracelluláris foszfo-RhoA elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 0,2 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva

- 25. anti-Ki-67 (F7268; Dako, Carpinteria, CA) az intranukleáris i-67 fehérje MIB-1 epitópja elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 1 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva
- 26. anti-DR4 (MA1-19025; Affinity Bioreagents, Golden, CO) az extracelluláris TRAIL-R1 elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 1 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva
- 27. anti-DR5 (MA1-19416; Affinity Bioreagents, Golden, CO) az extracelluláris TRAILR2 elleni monoklonális antitest PBS-ben oldva, 1 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva
- 28. ciszplatin [cis-diamminedichloroplatinum(II); FW 300.1] (Sigma–Aldrich Corporation, St Louis, MO) használat előtt frissen oldva
- 29. LA-12 [(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine) ammine dichloroplatinum(IV);
 FW 552,4] (Pliva-Lachema a.s., Brno, Czech Republic) használat előtt frissen oldva
- TRAIL (Human N-terminally His-tagged recombinant Apo2L/TRAIL; aminosavak
 95–281; Profos AG, Regensburg, Germany) használat előtt frissen oldva
- 31. Alexa Fluor 488-konjugált koleratoxin B alegység (CTX-B, Molecular Probes-Invitrogen) PBS-ben oldva, 0,7 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- 32. Alexa Fluor 647-konjugált koleratoxin B alegység (CTX-B, Molecular Probes-Invitrogen) PBS-ben oldva, 0,7 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva
- Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647 (Invitrogen) fluorofórok, a fehérjék fluoreszcens jelölését a gyártó leírása alapján végeztük, 4°C-n tárolva.
- 34. Cy3 fluorofórral konjugált kecske anti-egér Fab (Jackson Immunologicals) fuorofórral konjugált másodlagos antitest PBS-ben oldva, 1 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.

- 35. Alexa Fluor 488 kecske anti-egér IgG (Invitrogen) fuorofórral konjugált másodlagos antitest PBS-ben oldva, 1,5 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- 36. Alexa Fluor 546 szamár anti-nyúl IgG (Invitrogen) fuorofórral konjugált másodlagos antitest PBS-ben oldva, 1,5 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- 37. Alexa Fluor 647 szamár anti-kecske IgG (Invitrogen) fuorofórral konjugált másodlagos antitest PBS-ben oldva, 1,5 mg/ml-es törzsoldatban, 4°C-n tárolva.
- Egér-; nyúl- és kecske- IgG ellen szamárban termeltetett, peroxidázzal konjugált másodlagos antitest TBS-ben oldva, 1mg/ml-es törzsoldatban, -20°C-n tárolva.
- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) a peroxidáz enzim szubsztrátja, 4°C-on tárolva
- 40. Triton-X 100 (Thermo Scientific), szobahőmérsékleten tárolva
- 41. Tween 20, szobahőmérsékleten tárolva
- 42. Mowiol 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals), 10 w/v%, 0,1 M Tris-HCl-ben, pH 8,5, 25 w/v% glicerinnel
- A megjelölt kivételektől eltekintve az összes anyag a Sigma cég terméke.

5.2. A kísérletekhez használt sejtvonalak

A PDGF β receptor lipid-tutaj függő szabályozását a fehérjét expresszáló A172 és T98G jelű (American Type Culture Collection) kitapadva növő humán glioblasztóma sejtvonalakon vizsgáltuk. A sejteket 10% FCS-el kiegészített DMEM tápoldatban, 5% CO₂-t tartalmazó párásított légterű termosztátban, 37°C-n tenyésztettük. A konfokális mikroszkóppal végzett is situ mérésekhez a sejteket 12 mm-es fedőlemezek felszínére növesztettük, majd jelölés után a rárétegezett Mowiollal tárgylemezre borítottuk.

A passzálás 1-1,5x10⁵/cm² koncentrációnál történt. A passzáláshoz először kétszer mostuk a sejteket HEPES pufferben, majd 0,05% tripszint és 1 mM EDTA-t tartalmazó standard tripszin-EDTA puffert adtunk a tenyészethez. 3 perc múlva a tripszin-EDTA oldatot leszívtuk, és 10% FCS tartalmú DMEM-mel állítottuk le a sejteken maradt oldat hatását. A médiumban pipettával szuszpendáltuk fel a sejteket. Az így felvett sejteket számlálás után 10⁵/ml-re hígítottuk.

A PDGF receptorok membránbeli mintázatának vizsgálatához a konfluens és diszperz sejteket párhuzamosan, azonos ideig (2 vagy 3 nap) növesztettük, a különbséget a kitapasztott sejtek számának megválasztásával hoztuk létre. A konfluens kultúrákhoz 60.000/cm², a diszperzekhez 15.000/cm² sűrűségben passzáltuk a sejteket.

A kísérletben felhasznált sejtek nagyobb száma miatt a Western blot kísérletekben használt sejtkultúrák konfluenciáját más módszerrel állítottuk be. A passzálás napján egyenlő sejtszámban kezdtük el növeszteni a kultúrákat párhuzamosan 35 mm átmérőjű (~10 cm² felszínű) kis és 100 mm átmérőjű (~60 cm² felszínű) nagy Petri edényekben. A kezdeti sejtszám 570.000 sejt/edény volt. Előkísérletekkel tesztelve megállapítottuk, hogy 36 óra elteltével a sejtek mind morfológiailag, mind anyagcseréjüket tekintve biológiailag konfluens kultúraként viselkednek a kis Petri edényekben, míg a nagy Petri edényekben diszperz tulajdonságúként viselkednek, azonban a letapadt sejtek száma közel azonos a kétféle kultúrában

A tenyészetek konfluenciáját szemmel is kontrolláltuk: diszperznek tekintettük azon tenyészeteket, melyekben túlnyomóan különálló, egymással nem érintkező sejtek voltak láthatók. A konfluens tenyészetekben a sejtek legalább 5-15-sejtes csoportokban érintkeztek egymással.

A platinaszármazékok hatását a TRAIL receptorok lipid-tutaj lokalizációjára HCT-116 jelű humán vastagbél eredetű adenokarcinóma (American Type Culture Collection / LGC Promochem, Németország), illetve PC-3 jelű IV. grádusú prosztata karcinóma (American Type Culture Collection / LGC Promochem) sejtvonalakon vizsgáltuk. A sejteket 10% FCS-el kiegészített McCoy's 5a módosított tápoldatban, 5% CO₂-t tartalmazó párásított légterű termosztátban, 37°C-n tenyésztettük. A passzálást a glioblasztóma sejteknél leírt módon végeztük. A konfokális mikroszkópos mérésekhez a sejteket 12 mm-es fedőlemez felszínére növesztettük.

5.3. Glioblasztóma sejtek PDGF stimulálása

Az A172 és T98G jelű glioblasztóma sejtvonalakat PDGF-BB ligandummal végzett aktiválás előtt 120 percen keresztül indikátor- és szérummentes DMEM tápoldatban éheztettük. Közvetlenül a stimulálás előtt 5 percig szobahőmérsékletű HEPES-el mostuk a sejteket nedves kamrában. Ezután a sejtek felszínére 50 µl 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB oldatot pipettáztunk, majd kísérlettől függően 2-120 percig inkubáltuk azokat nedveskamrában 37°C-on. Ezt követően a sejteket 5 percig jéghideg HEPES-el mostuk, így leállítva a stimulálás hatását. Western blot kísérletek esetén a ligandummal végzett aktiválást felületarányosan nagyobb térfogatú oldattal végeztük el, továbbá a lízist megelőzően a másfél órán keresztül indikátor- és szérummentes DMEM tápoldatban éheztetett sejteket 1, 2, 5, 15,

30 és 60 percig stimuláltuk 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB liganddal. Kontrolként minden esetben stimulálatlan sejteket használtunk.

5.4. A vastagbél és prosztata karcinóma sejtek kezelése TRAIL ligandummal és platinaszármazékokkal

A HCT-116 és PC3 karcinóma sejtvonalakat a kezelések előtt 120 percen keresztül indikátor- és szérummentes DMEM tápoldatban éheztettük. Közvetlenül a kezelések előtt 5 percig szobahőmérsékletű HEPES-el mostuk a sejteket nedves kamrában. Ezután a sejtek felszínére kezeléstől függően 50 µl 10 µM-os ciszplatin (cDDP), 0,5 µM-os LA-12 vagy 5 ng/ml-es TRAIL oldatot pipettáztunk, majd 5-60 percig inkubáltuk azokat nedveskamrában 37°C-on. Ezt követően a sejteket 5 percig jéghideg HEPES-el mostuk, így leállítva a kezelés hatását.

5.5. Immunfluoreszcenciás jelölések

A glioblasztóma, illetve a vastagbél és prosztata karcinóma sejtvonalakat a 5.2 pont alatt leírt módon fedőlemezekre növesztettük. Ezt követően a mintákat jégre helyezett nedveskamrába tettük, és a további lépéseket itt végeztük el. A sejteket háromszor (1, 3, és 5 percig) mostuk HEPES pufferrel, majd 10 percig inkubáltuk a vizsgált receptorra specifikus monoklonális antitest telítő koncentrációjú HEPES pufferes oldatával. Ezután három HEPES pufferrel történő mosást követően a megfelelő fluoreszcens festékkel konjugált, 15 µg/ml koncentrációjú másodlagos antitesttel, illetve 4 µg/ml koncentrációjú A488-konjugált koleratoxin B alegységgel inkubáltunk 10 percig. Újabb három mosás után a sejteket 4 %-os frissen depolimerizált paraformaldehiddel 5 percig jégen, majd 5 percig szobahőmérsékleten fixáltuk.

A glioblasztóma sejtek esetén a különböző jelátviteli útvonalakra specifikus foszforilált Tyr716, Tyr751, Tyr771, illetve Tyr1021, valamint a pRhoA, illetve a cortactin és KI-67 fehérjék intracelluláris jelölését közvetlenül az extracelluláris antigének jelölését követően végeztük el. A sejteket 1%-os frissen depolimerizált paraformaldehiddel jégen 10 percig előfixáltuk, majd újabb 10 percen keresztül 0,1% Triton-X 100-at és 1% BSA-t tartalmazó HEPES oldattal permeabilizáltuk. Ezután a sejteket 35 percen keresztül, jégen, a megfelelő monoklonális antitestekkel inkubáltuk 0,05% Triton-X 100 1% BSA jelenlétében. A mintákat 2, 4, és 5 percig 0,05% Triton-X 100-at és 1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferrel mostuk, majd a sejteket 20 percen keresztül 0,05% Triton-X 100-at tartalmazó, az elsődleges antitestet jelölő Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647 konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 2, 4, illetve 5 percig 0,05% Triton-X 100-at és 1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferrel mostuk. Végül a mintákat 4 %-os frissen depolimerizált paraformaldehiddel 10 percig jégen, majd 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. A kolokalizációs kísérletek esetén HEPES pufferrel való 2x3 perces mosás után 20 µl Mowiolt pipettáztunk a sejtekre, majd azokat sejtekkel lefelé buborékmentesen tárgylemezre fordítottuk.

5.6. Konfokális mikroszkópia

A méréseket Zeiss LSM 510 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal végeztük. A Cy3 és Alexa Fluor 546 fluoreszcens festékeket HeNe lézer 543 nm-es vonalával, a fluoreszceint és az Alexa Fluor 488 festéket argon ion lézer 488 nm-es vonalával, az Alexa Fluor 647-et 633 nm hullámhosszúságú HeNe lézerrel gerjesztettük. A digitális képelemzéshez készült háromszorosan jelzett minták esetében az Alexa Fluor 488 fluoreszcencia detektálására 505-550 nm-es sávszűrőt, a Cy3 és Alexa Fluor 546 fluoreszencia detektálására 560-615 nm-es sávszűrőt, az Alexa Fluor 647 fluoreszencia detektálására 650 nm-es felüláteresztő emissziós szűrőt használtunk. Az 512 × 512 pixeles, 1 µm optikai vastagságú konfokális szeleteket 40× víz immerziós objektívvel (NA=1,2) készítettük, $14,6 \times 14,6 - 29,2 \times 29,2 \mu m$ közötti méretű területekről.

5.7. Digitális képfeldolgozás

5.7.1. Kolokalizáció meghatározása a keresztkorreláció alapján

A sejtfelszíni antigének kolokalizációs párjait a kettősen jelölt sejtek konfokális képeiből határoztuk meg. Az X, Y képpárból a keresztkorrelációs koefficienst az alábbi képlet alapján számoltuk ki:

$$C = \frac{\sum_{i} \sum_{j} (x_{i,j} - \overline{x})(y_{i,j} - \overline{y})}{\sqrt{\sum_{i} \sum_{j} (x_{i,j} - \overline{x})^2 \sum_{i} \sum_{j} (y_{i,j} - \overline{y})^2}}$$

ahol *x_{i,j}* és *y_{i,j}* az *i* és *j* koordinátáknál mért fluoreszcencia-értékek az x és y képen. Az összegzéshez mind a két képről csak azokat a pixeleket használtuk, melyek a detektálhatósági küszöb feletti értékkel rendelkeztek. Azonos képek esetén a teoretikus maximum érték C=1, a C=0 közeli érték pedig a két jelölés egymáshoz képest véletlenszerű lokalizációját jelzi. A számításokat LabView programnyelvben erre a célra írt programmal végeztük.

5.7.2. Digitális képelemző algoritmus a rafton belüli és rafton kívüli receptor, illetve specifikus foszfotirozin-sűrűség meghatározására

A sejtmembrán GM1 gazdag mikrodoménjeiben a specifikus foszfotirozin reziduumok denzitásának meghatározására az alábbi digitális képelemző algoritmust alkalmaztuk (4. *ábra*).



<u>4. ábra: Digitális képelemző algoritmus az aktivált PDGFR denzitás kvantitatív jellemzésére</u>

Első lépésben a GM1 pozitív raftokról készült képből a háttér meghatározásával két bináris maszkot hoztunk létre. Az első maszk a rafton belüli, a második a rafton kívüli területek kizárólagos figyelembe vételét tette lehetővé. A bináris maszkokat a pPDGFR intenzitás képre alkalmazva meghatároztuk a rafton belüli és rafton kívüli specifikus pixelenkénti receptorfoszforiláltságot, valamint annak eloszlását. Az illusztációban megjelenített konfokális felvételek PDGF stimulált A172 sejtek felszínéről készültek.

Első lépésben mind a GM1 gazdag területeket, mind a foszfotirozint és a PDGFR-t reprezentáló csatornákat a háttérintenzitással korrigáltuk. Ezt követően a lipid-tutajokat megjelenítő GM1 csatornáról két egymással inverz bináris maszkot hoztunk létre, mely maszkok lehetővé tették a rafton belüli és kívüli területek kizárólagos értelmezését. A PDGFR-t, illetve a foszfo-PDGFR-t reprezentáló képekre alkalmazva a bináris maszkokat a rafton belüli és kívüli területek receptor és foszforeceptor denzitás képeit kapjuk meg. Ezekből generáltuk a pixelintenzitások eloszlás hisztogramját, melyek eltolódásából, illetve átlagértékéből következtettünk a különböző kezeléseket hatására. A kísérlet során három független mérést végeztünk, kezelésenként legalább 40 sejtből kapott eredményt használtunk fel. A mikroszkópos képek elemzését ImageJ (NIH) programmal végeztük (79). Az ábrákon a görbék a 40-60 sejt kiértékeléséből kumulált pixelintenzitás-eloszlásokat, az oszlopdiagramok pedig, az egyszerűbb összehasonlíthatóság végett, az eloszlások átlagát mutatják.

5.7.3. Digitális képelemző algoritmus a rafton belüli és rafton kívüli átlagos specifikus receptorfoszforiláltság meghatározására

Ahhoz, hogy a rafton belüli és rafton kívüli átlagos specifikus relatív (Tyr716, Tyr771, Tyr751, Tyr1021) receptorfoszforiláltságot kvantitatívan, több független jelölés összevonásával is értékelhessük, a 5.7.2 pontban bemutatott digitális képelemző algoritmusunkat továbbfejlesztettük (5. ábra). Először normáltuk az egyes pixelekben mért aktivált, azaz foszforilált PDGF receptorokat jellemző intenzitást az összes receptor pixelenkénti mennyiségére. A GM1 pozitív raftokból készült két bináris maszkkal kapuzva meghatároztuk az átlagos rafton belüli és rafton kívüli specifikus relatív receptorfoszforiláltságot. Ahhoz, hogy több független kísérlet eredményét a jelölés és detektálás hatékonyságának figyelmen kívül hagyásával is összegezhessük, a továbbiakban a rafton belüli és kívüli receptorfoszforiláltság hányadosát vizsgáltuk különféle kezeléseket követően. A kísérlet során három független mérést végeztünk, összesen minta típusonként legalább 40-60 sejtből kapott eredményt használtunk fel.



5. ábra: Digitális képelemző algoritmus a rafton belüli és rafton kívüli átlagos receptorfoszforiláltság kvantitatív jellemzésére

A PDGF stimulált A172 glioblasztóma sejt felszíni membránszeletében mért aktivált PDGF receptorokat jellemező intenzitást az összes receptor pixelenkénti mennyiségére normáltuk, majd a GM1 pozitív raftokról készült képből a háttér meghatározásával két bináris maszkot hoztunk létre. Az első a raftok, a második a rafton kívüli területek kizárólagos figyelembe vételét tette lehetővé a hányados képen. A kapuzott képből meghatároztuk az áltagos rafton belüli és rafton kívüli relatív specifikus receptorfoszforiláltságot. Végül a rafton belüli és kívüli receptorfoszforiláltság hányadosát képeztük, hogy független kísérleteink eredményeit összehasonlíthassuk a különféle kezeléseket és független méréseket követően.

5.8. A foszfotirozin reziduumok és a jelátvitel végpontjainak vizsgálata

Western blot módszerrel

A teljes sejt lizátumokat konfluens és ritka A172 és T98G sejtvonalból készítettük. A konfluencia az 5.2 pontban leírtaknak megfelelően lett beállítva, a sejteket a 5.3 pontban leírtak szerint stimuláltuk. A stimulált és kontroll sejteket jéghideg HEPES pufferel mostuk, majd lizáltuk (RD lízis puffer; 2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF); 1 mM Na-orto-vanadát; proteáz inhibitor koktél gyártói előírás szerint). A lizátumok proteintartalmát Bradford módszere szerint megmértük és azt 6x-os mintapufferel kiegyenlítettük.

Referenciának a legkisebb protein koncentrációt tekintettük, azt nem hígítottuk, továbbá a kiegyenlítés előtti legkisebb és legmagasabb proteinkoncentráció közötti eltérés nem lehetett több 20 százaléknál. Amennyiben ezt az általunk kijelölt szintet meghaladtuk, a mintát nem használtuk fel. A fehérjetartalom kiegyenlítését követően a mintákat 6x-os mintapufferrel másfélszeresére hígítottuk és 10 percig 99°C-on inkubáltuk. A fehérjéket különböző sűrűségű SDS-PAGE géleken futtattuk és választottuk el. A gél minden fésűjébe 20 µg fehérje került. A futtatást követően a fehérjesávokat félszáraz blottólóval gélenként 100 mA áramerősség alkalmazásával poli(vinilidén)-fluorid membránra (Millipore, USA) vittük át. A membránt egy órán keresztül 5% zsírmentes tejport tartalmazó TBS pufferrel blokkoltuk, majd a vizsgált fehérjék ellen termeltetett monoklonális antitesttel jelöltük egy éjszakán át 4°C-on folyamatos billegő keverés mellett. Az antitesteket a gyártói leírások szerinti hígításban használtuk. Ezt követően a membránt fél órán keresztül többszöri oldatcserével mostuk TBS-Tween oldattal. Végül a membránokat 2 órán keresztül szobahőmérsékleten az elsődleges antitestnek megfelelő peroxidáz konjugált másodlagos antitesttel jelöltük. A másodlagos antitestet a gyári leírásnak megfelelő koncentrációban alkalmaztuk. A jelölést követően a membránt újból TBS-Tween oldattal mostuk egy órán keresztül, majd a peroxidáz előhívó oldattal inkubáltuk 3 percig. A Western blot eredményét Protein Simple Alphaimager géldokumentációs rendszerrel tettük láthatóvá.

5.9. A sejtkultúrák proliferációjának vizsgálata

A konfluens és ritka sejtkulturák proliferációját MTT alapú kolorimetriás esszével vizsgáltuk (EZ4U, Biomedica GmbH). Két nappal a mérés előtt a sejteket különböző kezdeti sejtkoncentrációkban (9000 sejt/cm² és 150,000 sejt/cm² között) lapos felszínű 96 lyukú sejttenyésző plate-re passzáltuk. EZ4U reagenssel történő inkubációt követően a felülúszó abszorbanciáját Synergy HT Multi-Detection microplate Reader (Bio-Tek) készülékkel

mértük 488 nm-en, és a 620 nm-es abszorbanciával korrigáltuk. Az így kapott abszorbancia értékeket a különböző kezdeti sejtsűrűségben passzált sejtkultúrák letapadása után közvetlenül meghatározott kalibrációs görbe segítségével konvertáltuk sejtszámokká. A sejtproliferációt a hat mérés átlagából számított (n=6) sejtszámok és a kiindulási sejtszám hányadosaként értelmeztük és a kezdeti denzitás függvényében ábrázoltuk.

A sejtosztódás valósidejű követésére impedancia alapú sejtadhéziós vizsgálatot (RTCA) végeztünk ECIS Z Θ készüléken (Applied Biophysics). A T98G sejteket olyan 8W10E PET 8-lyukú kamrában növesztettük, melynek a felszínén arany elektródák vannak. A kezdeti sejtsűrűségek 15.000 sejt/cm², illetve 60.000 sejt/cm² voltak. Gyenge váltakozó áramot alkalmazva az 1 – 10.0000 Hz frekvenciatartományban folyamatosan mértük a kitapadó sejtek által kialakított komplex impedanciaspektrumot. A mért impedancia minden időpillanatban arányos azzal a területtel, amit a kitapadó sejtek az elektródán lefednek. Az idő függvényében ábrázolt impedanciagörbék 4 kamra átlagát mutatják a kezdeti sejtszámokra normalizálva.

5.10. Statisztikai elemzés

Munkánk során a statisztikai vizsgálatokat XLSTAT modullal kiegészített MS Office Excel 2010 táblázatkezelő programmal végeztük.

Két független, normális eloszlást követő minta összehasonlítására Student-féle tpróbát, több minta esetén egy vagy kétutas ANOVA-t, a normális eloszlást nem követő minták esetén Kruskal-Wallis nonparametrikus ANOVA-t használtunk. Szignifikáns eltérések esetén az különbségek okát Tukey-féle post-hoc teszttel vizsgáltuk. Szignifikánsnak tekintettük az eltéréseket, ha p<0,05 volt.
6. Eredmények és megbeszélés

6.1. A PDGFR β lipid-tutaj- és konfluenciafüggő szabályozása glioblasztóma sejtvonalakon

6.1.1. A PDGFR β klaszteres eloszlást mutat és jelentős részben lipidtutajokban lokalizálódik

A PDGF receptorokat indirekt immunfluoreszcenciával, PDGF receptor ellen termeltetett primer antitesttel és Cy3 konjugált másodlagos antitesttel jelöltük a módszerekben leírtaknak megfelelően és konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal 1,5 mikronos optikai szeletekben vizsgáltuk. A lipid-tutajokat közvetlenül, koleratoxin B alegységhez kapcsolt Alexa Fluor 488 fluorofórral tettük láthatóvá. Megállapítottuk, hogy a receptort expresszáló A172 jelű (6/A ábra, felső sor) és T98G jelű (6/A ábra, alsó sor) humán glioblasztóma sejtvonalakon a receptorok kolokalizálódtak a lipid-raftokkal.



6. ábra: A PDGFR β raft-lokalizációja konfluenciafüggő

A: Az ábra bal oldalán látható sematikus rajzok jelölik azt a z magasságot, ahol az optikai szelet készült a sejtekből. Piros színnel az indirekt immunfluoreszcenciával jelölt sejtfelszíni PDGF receptorklaszterek, zöld színnel a CTX-B-vel direkt jelölt lipid-tutajok vannak prezentálva a felső sorban A172, az alsó sorban T98G

glioblasztóma sejteken. A piros és a zöld szín szuperpoziciójakor keletkező sárga szín a receptorklaszterek és a lipidraftok kolokalizációját jelzi. A felvételek azonos beállításokkal készültek, 40x-os objektívvel. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron. A látótér területe: 14,6 μ m × 14,6 μ m

B: Az átfedés kvantitatív értékelésére a keresztkorrelációs koefficienst vezettük be. A sárga oszlopok által reprezentált sejtkultúrák egységesen 15.000 sejt/cm² sejtsűrűségről indultak és négy napos kultivációt követően váltak konfluenssé. Mintavétel a kultiválás minden napján történt. A piros oszlopok által jelzett sejtkultúra változó (1-2-3, illetve 4 x 15.000 sejt/cm²) sejtsűrűségről indult, a mintavételre 24h inkubációt követően került sor. Az oszlopok három független kísérletben vizsgált 40-60 sejt átlagát (± SEM) mutatják.

A receptorok és lipid-tutajok kolokalizációjának kvantitatív értékelésére képelemző program segítségével meghatároztuk a keresztkorrelációs koefficienst (l. 5.7.1.). Ennek értéke -1 és 1 között változhat. Ha az értéke egy, akkor a két összehasonlított kép teljesen azonos, ha nulla, akkor a két képben az intenzitások egymáshoz képest véletlenszerűen oszlanak el. Megállapítottuk, hogy a sejtkonfluencia növekedésével arányosan nőtt a keresztkorrelációs koefficiens, azaz magasabb arányban lokalizálódnak a receptorklaszterek a lipid-raftokon belül (p<0,05). A kolokalizáció mértéke nem függött a kultúrában eltöltött időtől. Közel egyforma átfedést tapasztaltunk 15.000 sejt/cm² sejtszámról induló sejtkultúra n. napi (*6/B ábra, sárga oszlopok*) és az n × 15.000 sejt/cm² sejtszámról induló sejtkultúra másnapi vizsgálatakor (*6/B ábra, piros oszlopok*). A statisztikai összehasonlításra kétutas ANOVA tesztet használtunk. A konfluencia hatása szignifikánsnak bizonyult (p<0,05), viszont annak, hogy az adott konfluenciát a sejtkultúrában eltöltött idő, vagy a kirakási sejtsűrűség változtatásával értük el, nem volt jelentősége (p=0,38)

6.1.2. A PDGFR β lipid-tutaj és konfluenciafüggő aktiválódása

Az irodalom számos fehérje esetén leírja, hogy a raft lokalizáció nem egyszerűen molekuláris szerveződési – morfológiai – jelenség, hanem funkcionális következményei is vannak. Számos raft asszociált membránfehérje sokkal hatékonyabb résztvevője a különböző jelátviteli folyamatoknak, mint a raftokon kívül elhelyezkedők (*12*). Emiatt feltételeztük, hogy

a PDGF receptorok konfluencia és raftfüggő szabályozása befolyásolja a receptor aktiváltsági állapotát.

Legelőször arra kerestük a választ, hogy 2 perces, 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandummal végzett aktiválás hogyan befolyásolja a specifikus tirozin reziduumokon foszforilált receptorok eloszlását konfluens és ritka sejtek membránjában. A PDGF receptor specifikus jelátviteli útvonalait elindító foszfotirozin reziduumokat indirekt immunfluoreszenciával jelöltük, membránbeli eloszlásukat a 5.7.2. pontban bemutatott digitális képelemző algoritmussal kvantitáltuk.

A receptor intracelluláris Tyr716 reziduumának foszforilációja kulcsfontosságú lépés a Ras-MAPK proliferációs útvonal megindításában (43). Kezeletlen sejtkultúrák esetén az aktivált Tyr716 denzitása a sejtmembránban független a sejtkonfluenciától. Két perces 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandummal végzett aktiválást követően az aktivált Tyr716 sűrűséggel arányos átlagos pixelintenzitás a ritka sejtek raftjaiban megemelkedett. Ennek megfelelően a raftokon belüli pTyr716-ot jellemző intenzitás eloszlás görbe (7/A ábra, fekete vonal) a magasabb értékek felé eltolódott. Az átlagos intenzitás értékek összevetéséből megállapítottuk, hogy a nyugvó kultúrák esetén az aktivált Tyr716 eloszlása a sejtmembránban független a sejtek konfluenciájától (8/A ábra, 1. és 3. oszlop párok). PDGF-BB ligandummal végzett aktiválást követően az aktivált Tyr716 denzitással arányos átlagos pixelintenzitás a ritka sejtek membránjában emelkedett meg, és a hatás kifejezettebb volt a raftokon belül (8/A ábra, sárga oszlopok).



7. Ábra: A különböző foszfotirozin reziduumok eloszlása a membrán GM1 gazdag doménjeiben

Az ábrán a raftokban lokalizált PDGFRβ egyes foszfotirozin reziduumainak pixelenkénti intenzitás eloszlása látható kezeletlen, illetve PDGF-BB stimulált állapotokban konfluens és ritka sejtek raftjaiban.

Az aktivált Tyr716-ot jellemző intenzitás eloszlás görbéket az **A**; a pTyr751-esét a **B**; a pTyr771-esét a **C**; a pTyr1021-esét a **D** diagram mutatja. Az ábrán a zöld vonalak rendre a kezeletlen ritka $(1,5 \times 10^4 \text{ sejt/cm}^2 \text{ sejtsűrűség})$ a fekete vonalak a 2 percig 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB liganddal stimulált ritka, a kék vonalak a kezeletlen konfluens $(1,5\times10^5 \text{ sejtsűrűség})$, a piros vonalak a ligandstimulált konfluens kultúrákat jellemzik.

A görbék 40-60 sejtből kumulált pixelintenzitás-eloszlást mutatnak.

Az aktivált Tyr751-es részt vesz az Akt kináz aktivációjában a PI3-kináz útvonalon keresztül (47). A foszforilált tirozin 751 denzitása nyugvó diszperz kultúrákban magasabb volt - elsősorban a lipid-tutajokon belül, mint nyugvó sűrű kultúrákban (8/B ábra, sárga oszlopok). PDGF-BB ligandummal végzett aktiválást követően a konfluens sejtek membránjában ezen aktivált foszfotirozinok mennyisége nem nőtt számottevően (7/B ábra, piros vonal, illetve 8/B ábra piros oszlopok), míg ritka sejtek raftjaiban a pTyr751 intenzitás növekedését láttuk (7/B ábra, fekete vonal, illetve 8/B ábra sárga oszlopok).

A Ras-GAP-ot aktiváló Tyr771-es a Ras-MAPK proliferációs útvonal regulációjában vesz részt a Tyr716-ossal ellentétben inhibitorként (46). Az aktivált Tyr716-oshoz hasonlóan

nyugvó kultúrák membránjában a konfluenciának nincs hatása a fehérjék eloszlására (8/C ábra). Ligandummal végzett aktiválást követően a konfluens sejtek membránjában mért átlagos pixelintenzitás megnőtt (8/C ábra, piros oszlopok). A hatás a raftokon belül jóval kifejezettebb volt, amit az intenzitás eloszlás görbe jelentős eltolódása is mutat (7/C ábra, piros vonal, illetve 8/C ábra, piros oszlopok).



<u>8. ábra: A különböző foszfotirozin reziduumok denzitása a sejtmembránban</u> Az ábrán a 7. ábra intenzitás-eloszlás görbéinek átlagát ábrázoltam a rafton belüli, illetve azokon kívüli területeken kezeletlen, illetve 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandkezelt sejtekben. A pTyr716-ot jellemző átlagos intezitást az A; a pTyr751-esét a B; a pTyr771-esét a C; a pTyr1021-esét a D diagram mutatja. A sárga oszlopok a ritka, 1,5 x 10^4 sejt/cm² sejtsűrűségben tenyésztett kultúrákat, a **piros oszlopok** a konfluens, 1,5 x 10^5 sejt/cm² sűrűségű kultúrákat jellemzik.

A PLC-t aktiváló Tyr1021-es aminosavnak kulcsfontosságú szerepe van a ligandstimulációt követő kétfázisú kalciumválasz beindításában (49). Nyugvó kultúrák esetén mind a rafton belül, mind azokon kívül a foszorilált Tyr1021 denzitást jellemző átlagos pixelintenzitás közel azonos a konfluens és ritka sejtek membránjában (8/D ábra). PDGF-BB ligandstimulációt követően a konfluens sejtek membránjában a specifikusan aktivált

receptorok a lipid-tutajokhoz asszociálódtak, amit az intenzitás eloszlás görbék magasabb értékek felé történő eltolódása jelez (7/D ábra, piros vonal, illetve 8/D ábra, piros oszlopok). Meg kell említeni, hogy a pTyr1021 denzitása a ritka sejtek rafton kívüli területein is fokozódott a stimulációt követően (8/D ábra, sárga oszlopok).

6.1.3. A PDGFR β relatív specifikus foszforiláltsága függ a sejtkonfluenciától és a receptorok lipid-tutaj lokalizációjától

A ritka és konfluens kultúrában tenyésztett A172 glioblasztóma sejtek membránjának hármas jelölésekor egyazon konfokális szeletben tudtuk vizsgálni a receptorok sejtfelszíni mintázatának, raft lokalizációjának és aktiváltsági állapotának változását ligandummal végzett aktiválást követően (9. *ábra*). Látható, hogy PDGF-BB stimulációt követően mind a tirozin foszforiláció, mind a receptorok raftbeli lokalizációja a sejtkonfluencia függvényében változott. A képek szubjektív elemzése azt mutatta, hogy míg a ritka sejtek membránjának GM1 gazdag doménjeiben a Tyr716-os (9. *ábra, C kép*) és Tyr751-es (9. *ábra, G kép*) aminosav foszforilálódott, addig a konfluens sejtek raftjaiban a Tyr771-es és Tyr1021-es aminosavak foszforilációja dominált (9. *ábra, L és P képei*).

PDGFRB	KEZEL	ETLEN	20 ng/ml	PDGF-BB
GMI pTYR	RITKA	KONFULENS	RITKA	KONFLUENS
pTyr716	A	В	C	D
pTyr751	E	F	G	H
pTyr771		J	K	
pTyr1021	M		•	P

9. ábra: A PDGFR foszforiláltsága és raft-lokalizációja

A konfokális mikroszkópos felvételek a receptorok sejtfelszíni mintázatán (piros) és raft lokalizációján (zöld) túl tájékoztatást nyújtanak azok specifikus aktiváltsági állapotáról, a tirozin foszforiláció mértékéről is. A foszfotirozinra specifikus monoklonális antitestet Alexa Fluor 647-tel konjugált másodlagos antitesttel jelöltük, ezt az ábra kék színnel mutatja. Kezeletlen ritka (A;E;I;M képek) és konfluens (B;F;J;N képek) sejtek esetén a piros, zöld és kék színeket részben elkülönülten látjuk, a raftok és foszfotirozin átfedés mértéke nem számottevő. 2 perces 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandummal végzett stimulálást követően a három szín egymásra vetülését figyelhetjük meg (összegzett színként fehér látszik) a pTyr716 (C kép) és a pTyr751 (G kép) esetén a ritka sejtek, míg a pTyr771 (L kép) és a pTyr1021 (P kép) esetén a konfluens sejtek membránjában. A képeket ZEISS LSM 510 konfokális mikroszkóppal $40 \times víz$ immerziós objektívvel (NA=1,2) készítettük. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron volt. A látótér területe: 21,3 µm × 21,3 µm

Képelemző algoritmusunk (5.7.3.) segítségével meghatároztuk a sejtfelszín relatív receptorfoszforiláltságának lipid-tutajon belüli és azon kívüli megoszlását. A módszer lehetővé tette a foszfotirozin reziduumok sejtfelszíni eloszlásának meghatározásán túl (6.1.2 pont eredményei) az egyes specifikus aktivitások membránbeli lokalizációjának vizsgálatát az összes expresszált receptorra vonatkoztatva. Ehhez a módszertani részben leírtaknak (5.7.3. pont) megfelelően a foszforilált intracelluláris tirozinokból származó jelet pixelenként normáltuk az sejtfelszínen expresszált összes receptorból származó jelre, majd két, a GM1 képből előállított bináris maszkkal lehetővé tettük a rafton belüli és azokon kívüli területek

különálló értelmezését és vizsgálatát. Ezzel az eljárással információt kaptunk a rafton belüli és kívüli specifikus (relatív) receptorfoszforiláltságról. Annak érdekében, hogy a különböző független kísérletekből származó eredmények összehasonlíthatóak legyenek, a rafton belüli és azon kívüli receptorfoszforiláltság hányadosát vizsgáltuk (*10. ábra*). Amennyiben ennek a hányadosnak az értéke magasabb, mint 1, akkor a rafton belüli területeken a receptorok foszforiláltsága így azok aktivitása magasabb, mint az azokon kívül esőkön.

Megállapítottuk, hogy stimulálatlan sejtek esetén a pTyr1021-es kivételével (10/D ábra) a specifikus relatív receptorfoszforiláltság magasabb a lipid-tutajokon kívül eső membránterületeken (10/A;B;C;D ábra, kezeletlen oszlopok). Ezt a receptorfoszforiláltság kvantitatív jellemzésére bevezetett hányados 1 alatti értéke mutatja.

PDGF-BB stimulációt követően a különböző jelátviteli útvonalakat szabályzó tirozin reziduumok aktivitásprofilja jelentősen eltért a ritka és konfluens sejtek raftjaiban. A Ras-MAPK proliferációs útvonalat stimuláló Tyr716 aktiváltsága elsősorban a ritka sejtek GM1 gazdag doménjeiben fokozódott (10/A ábra), míg az ugyanezt gátló Tyr771 a konfluens kultúrák lipid-raftjaiban foszforilálódott (10/C ábra). A két tirozin reziduum rafton belüli és kívüli foszforiláltságának hányadosa 1,6, illetve 1,8, azaz a raft asszociált receptorok mintegy 60%-kal, illetve 80%-kal nagyobb arányban aktiválódtak ligandummal végzett aktiválást követően.



10. ábra: Az átlagos specifikus receptorfoszforiláltság változásának sejtkonfluenciafüggése A172 glioblasztóma sejtekben

Az ábra a kezeletlen és 20ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandstimulált A172 glioblasztóma sejtek membránjának rafton belüli és azokon kívül eső területein mért relatív specifikus receptorfoszforiláltság hányadosát mutatja. Az aktivált pTyr716-ét az **A**; a pTyr751-ét a **B**; a pTyr771-ét a **C**; a Tyr1021-ét a **D** rész mutatja. Az ábrán a **sárga oszlopok** ritka, 1,5 x 10^4 sejt/cm² sejtsűrűségben tenyésztett kultúrákat, a **piros oszlopok** konfluens, 1,5 x 10^5 sejt/cm² sűrűségű kultúrákat jellemeznek. A hányados numerikus értéke jellemzi a foszforiláltság membrántopológiai megoszlását. Egynél magasabb érték azt mutatja, hogy a relatív specifikus receptorfoszforiláltság a raftokon belül volt magasabb. Az oszlopok három független kísérlet (háromszor 13-18 sejt) átlagos receptorfoszforiláltságának az átlagát (± SEM) ábrázolják.

A sejtek túlélését szabályzó PI3-kináz útvonal a Tyr751-es oldalláncáról, a sejtek migrációs válaszában és a kétfázisú kalciumválasz megindításában szerepet játszó PLCγ útvonal a Tyr1021 oldalláncáról indul el. Megállapítottuk, hogy a Tyr751-es a diszperz sejtek raftjaiban aktiválódott, a rafton belüli és azokon kívüli receptorfoszforiláltság hányadosa 1,6 volt, azaz ligandummal végzett stimulálást követően a ritka sejtek raftjain belül 60%-kal hatékonyabban aktiválódtak a receptorok, mint a raftokon kívül (*10/C ábra*). A Tyr1021-es foszforilációja a konfluens sejtek GM1 gazdag doménjeiben következett be (*10/D ábra*). A lipid-tutajokon belül a receptorok specifikus Tyr1021 aktiváltsága kétszerese volt a raftokon

kívül eső területekének. A statisztikai összehasonlítást kétutas ANOVA teszttel végeztük. A receptorfoszforiláltság ligandummal végzett aktiválás hatására bekövetkező változása szignifikánsnak bizonyult (p<0,05), mind a kezeletlen kontroll, mind a kezelt konfluens (Tyr716 és Tyr751), illetve ritka (Tyr771 és Tyr1021) sejtekhez képest.

6.1.4. A Ras-MAPK útvonal aktivitása és a következményes sejtproliferáció ritka kultúrákban dominál

Az előzőekben ismertetett eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a receptor foszforiláltság raft-függő, illetve a receptorok sejtfelszíni lokalizációjának konfluenciafüggő szabályozása funkcionális következményekkel bírhat. Hipotézisünket Western blot analízissel vizsgáltuk, melynek menetét a módszertani részben ismertettem. A különböző jelátviteli útvonalakban részt vevő specifikus aktivátor és effektor proteinek expressziós szintjeit különböző időtartamú PDGF-BB stimulálást követően vizsgáltam ritka és konfluens kultúrákból preparált sejtlizátumokban.

A Ras-MAPK útvonal nagy szerepet játszik a sejtproliferáció és a stresszre adott sejtválasz szabályozásában. Az útvonalat a PDGF receptor Tyr716 foszforilációja aktiválja, míg a pTyr771 mint negatív regulátor játszik szerepet az inhibitor Ras-GAP fehérje aktiválásán keresztül. Kísérleteinkben a receptort expresszáló A172 és T98G jelű glioblasztóma sejtvonalon két MAP kináz aktiváltsági állapotát vizsgáltuk meg a PDGF-BB stimulálás időfüggésében. Az MKK3/MKK6 kinázok által aktivált p38 MAPK elsősorban stressz indukált kináz, mely kulcsfontosságú a gyulladásos válaszban, míg a főleg receptor tirozinkinázok által aktivált p42/p44 MAPK-t inkább a proliferáció és differenciáció szabályozójaként tartják számon (*43*).

A Western blot analízis alapján megállapítottuk, hogy mindkét stimulált glioblasztóma kultúra diszperz sejtjeiben a Tyr716 foszforilációja megnőtt. Ilyen változás konfluens

sejtekben nem történt (*11. ábra pTyr716 sor*). PDGF-BB stimulust követően az ellenreguláló Tyr771 elsősorban a konfluens kultúrákban foszforilálódott, de kisebb mértékű aktivitás növekedés a ritka sejtek esetén is látható (*11. ábra pTyr771 sor*). Mindkét foszfotirozin esetében az aktivitás maximuma 1-5 perces stimulust követően jelentkezett. A Western blot analízis összességében megerősítette konfokális mikroszkópiás eredményeinket.

		RITKA						KONFLUENS							
20 ng/ml PDGF-BB		0'	1'	2'	5'	15'	30'	60'	0,	1'	2'	5'	15'	30'	60'
pTyr	A172		-	inger (-	(
716	T98	No.	-	-		n ji	4			940			¢		
pTyr 771	A172		1986 - J	85	Inte	-	23			100	interest	-	-	1	
	T98	1		-	-	-	-	Second		-	-	-	123	192	1
pP38	A172	-	r.		-	-		-	-			-	-	-	-
MAPK	T98	-	-	-	-	-		-	-		-		-	-	-
pP42	A172			-		-	-	-	-	-	-				
MAPK	T98				_	-	-		-	-			-	-	- internet
AKTIN	A172	-	_	-	-	-	-		-		-	-	-	_	-
	T98	-	-	-	-				_		-	-		******	-

<u>11. Ábra: A Ras-MAPK proliferációs útvonal konfluenciafüggő szabályozása</u> A Western blot minták a Tyr716-os és Tyr771-es specifikus foszfotirozin jelének változását, továbbá a p38-as, illetve a p42-es MAPK aktiválódását mutatják A172 és T98G sejtvonalakban különböző időtartamú (0'-1'-2'-5'-15'-30'-60') 20ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandummal végzett aktiválást követően. Az ábra alsó két sora az aktin kontrollt mutatja.

Megállapítottuk továbbá, hogy ligandummal végzett stimulálást követően az aktivált pP38 fehérje mennyisége a ritka sejtekben megnőtt, míg a konfluens kultúrában az aktiváltság gyakorlatilag nem változott. Ritka kultúrákban 15-30 perces ligandstimulussal lehetett maximális aktivitásnövekedést kiváltani (*11. ábra pP38 sorok*).

A p42 fehérje ligandummal végzett aktiválást követően aktívabb volt a ritka sejtekben, de a T98G sejtvonal esetén a konfluens kultúrában 15 és 30 perces stimulust követően is tapasztaltunk aktivitás emelkedést (*11. ábra pP42 sorok*).

Western blot analízissel igazoltuk, hogy a sejtek proliferációját szabályozó Ras-MAPK útvonal eltérően szabályozódik stimulált ritka és konfluens glioblasztóma kultúrákban. A proliferációt stimuláló útvonalak elsősorban a ritka, az inhibitor hatásúak a konfluens kultúrákban domináltak.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy ez az eltérő szabályozás érvényesül-e a jelátvitel végpontján, azaz a sejtek proliferációjának a szintjén. Kísérleteinkben az onkológiai rutinban proliferációs markerként használt KI-67 fehérje expresszióját vizsgáltuk 2 h PDGF-BB stimulust követően konfluens és ritka A172 glioblasztóma kultúrákban.

A MKI67 néven is ismert Ki-67 antigén, amit az *MKI67* jelű gén kódol (*80*), egy olyan speciális sejtmagban lokalizált fehérje, ami szükséges a sejtproliferációhoz. A fehérje nélkülözhetetlen a riboszómális RNS transzkripciójához (*81*), inaktiválása az RNS szintézis leállásához vezet (*82*). A Ki-67 elterjedten használt a klinikai diagnosztikában mint proliferációs marker, hiszen megfigyelhető a sejtciklus minden aktív szakaszában (G1; S; G2; mitózis), de nyugvó sejtekben (G0) detektálhatatlan (*83*).

Konfokális mikroszkópiás felvételeken megállapítottuk, hogy összhangban a ritka sejtkultúrában mért emelkedett MAPK aktivitással, a Ki-67 fehérje expressziós szintje jelentősen magasabb volt a ritka sejtek magjában (*12. ábra F kép*).

	RIT	KA	KONF	LUENS
	KEZELETLEN	2h PDGF-BB	KEZELETLEN	2h PDGF-BB
PROPIDIUM-JODID	A	B		
Ki-67	E	F	G	H

12. Ábra: A proliferációs aktivitás vizsgálata

Az A172 sejtek proliferációs aktivitását a Ki-67 proliferációs marker indirekt immunfluoreszcenciás jelölésével tettük láthatóvá (**Ki-67** sor), az egyes látóterekben található összes sejtmagot propídium-jodidal (**propídium-jodid** sor) jelöltük. A képeket ZEISS LSM 510 konfokális mikroszkóppal $40 \times v$ íz immerziós objektívvel (NA=1,2) készítettük. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron volt. A látótér területe: 116,8 µm × 116,8 µm

Két független kísérlet 3-3 random választott látóterének elemzését követően azt találtuk, hogy 2 h PDGF-BB stimulust követően a látótér összes propídium-jodid festéssel megjelölt (*12. ábra propídium-jodid sor*) sejtmagjának 85%-a mutatott erős Ki-67 pozitivitást (*12. ábra F kép*) a ritka sejtek esetén, míg konfluens kultúrákban ez az arány 1% alatt maradt (*12. ábra H kép*). Utóbbi kultúrában az összes mag 12%-a enyhe intenzitásnövekedést mutatott a Ki-67 jelet reprezentáló csatornában. Stimulus nélkül a sejtkonfluenciától függetlenül nem tapasztaltunk proliferációs aktivitást, ami a szérummegvonás hatásának tudható be (*12. ábra E és G képek*).

A ritka sejtkultúrákban tapasztalt aktívabb sejtproliferáció közvetlen bizonyítására a sejtek metabolikus aktivitásán alapuló MTT kolorimetriás esszét végeztünk. A korábbi kísérletek alapján a kezdeti sejtsűrűséget a 9.000 sejt/cm2 és 150.000sejt/cm2 közötti tartományban változtattuk mindkét vizsgált sejtvonal esetén. A hisztogramon ábrázolt sejtproliferáció (*13/A ábra*) a két nap inkubációt követően meghatározott metabolikus

aktivitás és a kezdeti aktivitás hányadosaként van kiszámítva az "Anyagok, módszerek" fejezetben leírtak szerint.

Megállapítottuk, hogy míg a legkisebb sejtsűrűségek esetén a kiindulási sejtszám két nap alatt megduplázódott (sejtproliferáció:~2), addig a közepes és nagy sejtsűrűségek esetén mért proliferációs aktivitás visszafogottabb maradt (sejtproliferáció:~1,2-1,5). Extrém nagy kezdeti sejtsűrűség esetén a sejtek össz metabolikus aktivitása nem nőtt, sőt, a T98G sejtvonal esetén csökkent is.

A konfluens és ritka sejtkultúrák proliferációs kinetikájának valós idejű összehasonlítását impedancia alapú sejtadhéziós vizsgálattal (RTCA) végeztük el a T98G sejtvonalon (*13/B ábra*). A sejtproliferációt a kiindulási sejtszámmal normalizált felszíni lefedettséggel jellemeztük és az eltelt idő függvényében ábrázoltuk. Méréseink azt mutatták, hogy az inkubáció első tizennyolc órájában a sejtek letapadnak (*ennek végét jelzi a fekete nyíl*), majd szétterülnek a rendelkezésükre álló felszínen. Az impedancia növekedése ebben a szakaszban a sejtosztódástól független. Ezután (a *szaggatott nyíltól*) kezdődik az aktív növekedés, ahol az impedancia változását a sejtproliferáció okozza. Az ábrán jól látszik, hogy a ritka kultúra esetén meredekebb a görbe, a sejtek nagyobb ütemben szaporodnak, mint a konfluens kultúrában. Fontos megjegyeznünk, hogy a kezdeti sejtszámmal való normalizálás a konfluens kultúrát jellemző impedanciagörbét ugyan az alacsonyabb tartományba tolja el, de a sejtszám megduplázódásához szükséges időre nincs kihatása.

45



<u>13. Ábra: A sejtosztódás és a kezdeti sejtsűrűség kapcsolata</u> A 9.000 sejt/cm² és 150.000 sejt/cm² közötti kezdeti sejtkoncentrációkban lapos felszínű 96 lyukú sejttenyésző plate-re passzált sejtkultúrák metabolikus aktivitását MTT alapú esszével határoztuk meg. és frissen letapadt sejtek abszorbanciája alapján konvertáltuk sejtszámokká. A sejtproliferációt hat mérés átlagából számoltuk (n=6), és a kiindulási sejtszámokra normalizálva a kezdeti denzitás függvényében ábrázoltuk (**A** diagram).

A T98G sejtvonal proliferációjának valósidejű követésére impedancia alapú sejtadhéziós vizsgálatot (RTCA) végeztünk ECIS Z Θ készüléken. A kezdeti sejtsűrűség 15.000 sejt/cm² volt ritka, illetve 60.000 sejt/cm² volt konfluens sejtkultúra eseten. A mért impedancia minden időpillanatban arányos azzal a területtel, amit a kitapadó sejtek az elektródán lefednek. Az idő függvényében ábrázolt impedanciagörbék 4 kamra átlagát mutatják a kezdeti sejtszámokra normalizálva (**B** diagram). A sejtkultúra letapadási szakaszának végét jelzi a **fekete** nyíl, ezután a sejtek szétterülnek. A szétterülést követő proliferációs szakasz kezdetét a **szaggatott** nyíl mutatja.

6.1.5. A PLCγ útvonal aktivitása és a következményes sejtmigráció konfluens kultúrákban dominál

Western blot analízissel megerősítettük konfokális mikroszkópiás eredményeinket, azaz a Tyr751-es a ritka, míg a Tyr1021-es elsősorban a konfluens sejtekben foszforilálódott stimulus hatására (*14. ábra pTyr751; pTyr1021 sorok*). A PI3K túlélési útvonalat aktiváló Tyr751 1 perces PDGF-BB ligandstimulust követően aktiválódott, a hatás maximuma 2-15 perces ligandummal végzett aktiválás között volt és 60 perces stimulálálás után a foszforiláció szintje a kiindulási értékre csökkent. A hatás a ritka sejtkultúrákban dominált (*14. ábra pTyr751 sorok*). Megfigyeltük, hogy a ritka és konfluens sejtekben a tirozin foszforiláció szintjén mért különbség nem érvényesül a jelátviteli útvonalban intermedier elhelyezkedésű Akt foszforilációjában, amit magyarázhat, hogy a fehérjét szabályozó foszfoinozitid szintet a PI3K-n kívül a különböző tumorok progressziójában szerepet játszó PTEN (Phosphatase and tensin homolog) is szabályozza(84) (14. ábra pAkt sorok).

		RITKA									K	ONFI	UEN:	5	
20 ng/ml PDGF-BB		0,	1,	2'	5'	15'	30'	60'	0,	1'	2'	5'	15'	30'	60'
pTvr	A172			-	-		-	Reas		-	-	6.4		lica	6.4
751	T98		homes	-	-		-	1.5			-		1 10	122	0
pTyr	A172	i e e Tierra		-		é 9	8.6	é pe	1		-				- 4
1021	T98	log-	R .e	189	1 10		1 100	1		- Eos		-	i 100	1	
- Alt	A172	Sec.	and the	and the	1000	, , , , , , , ,	-	-	-	-	a itan	1	- 19-00	-	-
рлк	T98		(11)		R esta	-	-	-			-574	-	-	-	-
-Ph.A	A172	-			1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pKhoA	T98	μ.,	12			8.	100	L.,		-	-	-	-	-	-
AKTIN	A172	-	-		-	-			-	-	-	-	-	-	-
	T98			-	-	-	-	-	_	-	-				

<u>14. Ábra: A PI3K és PLCγ útvonalak konfluenciafüggő szabályozása</u> A Western blot minták a Tyr751-es és Tyr1021-es specifikus foszfotirozin jelének változását, továbbá az Akt, illetve a RhoA fehérjék aktiválódását mutatják A172 és T98G sejtvonalakban különböző időtartamú (0'-1'-2'-5'-15'-30'-60') 20ng/ml koncentrációjú PDGF-BB ligandummal végzett aktiválást követően. Az ábra alsó két sora az aktin kontrollt mutatja.

A kétfázisú kalciumválasz kiváltásában szerepet játszó PLCγ útvonal a PDGF receptor aktivált Tyr1021-es reziduumáról indul ki. Az irodalom még nem írt le pontosan egy igazolható kimeneti pontot sem, ami egyértelműen és kizárólagosan a kalcium válasz által szabályozott. Az irodalomban számos publikáció foglalkozik a különböző külső stimulusok hatására bekövetkező sejtmigráció kalciumfüggésével (85). A migráció folyamatában a kalcium befolyásolja az aktin citoszkeleton és így a fokális adhéziós plakkok átrendeződését (86). Mindezek mellett a sejtekben leírtak úgynevezett "kalcium flicker" mikrodoméneket, amelyeket a PLCγ útvonal szabályoz. A mikrodomének a migrációs frontvonalon bedúsulva képesek a sejtek migrációját közvetlenül is irányítani (87). Feltételeztük, hogy a megnövekedett intracelluláris kalciumszint befolyásolja az aktin citoszkeleton átépülését, ezért a Tyr1021-hoz kapcsolódó vizsgálatokat egy, a sejtmigrációhoz szorosan kötődő intracelluláris fehérje, a RhoA vizsgálatával egészítettük ki.

A Tyr1021 foszforilációja, hasonlóan a többi vizsgált tirozinhoz, a stimulálást követő első percben megkezdődik és a hatás 30 perc alatt lecseng. A hatás maximuma 2-5 perces ligandummal végzett aktiválást követően alakult ki. Mindkét vizsgált glioblasztóma sejtvonal esetén megfigyeltük, hogy a pTyr1021 jel magasabb a konfluens sejtek esetén (*14. ábra pAkt sorok*). A PLC γ / PKC útvonal fontos effektor hatása a RhoA fehérje foszforilációja (*52*), ami a tirozin foszforilációnak megfelelően a konfluens sejtekben volt magasabb (*14. ábra pRhoA sorok*).

Konfokális mikroszkópiás eredményeink megerősítették, hogy 2h PDGF-BB stimulálást követően a konfluens sejtek mindkét kezeletlen kontroll, illetve a kezelt ritka sejtkultúrákhoz képest jóval magasabb pRhoA immunfluoreszenciás jelölődést mutattak (15. *ábra p-RhoA sor*).

	RIT	KA	KONF	KONFLUENS					
	KEZELETLEN	2h PDGF-BB	KEZELETLEN	2h PDGF-BB					
P-RioA	A	B	C'	D					
CORIACTIN	E j j	F	G	H					

15. Ábra: A migrációs aktivitás vizsgálata

Az A172 sejtek migrációs aktivitását a RhoA (**p-RhoA** sor) és a cortactin (**cortactin** sor) migrációs markerek indirekt immunfluoreszenciás jelölésével tettük láthatóvá. A képeket ZEISS LSM 510 konfokális mikroszkóppal $40 \times v$ íz immerziós objektívvel (NA=1,2) készítettük. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron volt. A látótér területe: 87,6 µm × 87,6 µm

Feltételeztük, hogy a PLC γ útvonal aktivációjának sejtkonfluencia-függő szabályozása funkcionális jelentőséggel bír a sejtek migrációjának a szintjén. A cortactin egy RhoA által regulált (88) fehérje, ami részt vesz a fokális adhéziós plakkok kialakításában és így a sejtmigráció szabályozásában (89). Megállapítottuk, hogy a fehérje akkumulációja a migrációt irányító fokális adhéziós plakkokban sejtkonfluencia-függő. Míg stimulálatlan diszperz sejtkultúra esetén a cortactin a sejtmembrán alatti klaszterekben gyűlik össze (15. ábra E kép), addig konfluens sejtekben citoplazmatikus lokalizációt mutat (15. ábra G kép). 2 h PDGF-BB ligandstimulációt követően a ritka sejtekben a cortactin mennyisége csökken, lokalizációja perinukleárissá válik (15. ábra F kép), míg konfluens sejtekben mennyisége megnő, és a polarizált sejt vezető szélén kialakuló kitüremkedésekben, a lamellipodiumokban akkumulálódik (15. ábra H kép).

6.2. Platina alapú kemoterápiás szerek és a TRAIL raftfüggő szinergizmusa a DR4 és DR5 mediált, kaszpáz-8 dependens apoptózis indukciójában

6.2.1. A TRAIL receptorok a sejtfelszínen klaszteres elrendeződést mutatnak és jelentős részben átfednek a lipid-tutajokkal

Kísérleteinkben egy új platina-komplex az LA-12 érzékenyítő hatását vizsgáltuk vastagbél- és prosztatarák sejtvonalak TRAIL mediált apoptózisa során, továbbá összehasonlítottuk az új gyógyszerjelölt hatékonyságát és raft-hatásait a kemoterápiás szerként elterjedten alkalmazott ciszplatin hatásával.

Megállapítottuk, hogy a DR4 és DR5 típusú TRAIL receptorok a sejtfelszínen klaszteres eloszlást mutatnak, amelyek átfednek a sejtmembrán GM1 gazdag lipid mikrodoménjeivel (16. ábra).



16. Ábra: A TRAIL receptorok a sejtfelszínen jelentős részben átfednek a lipidtutajokkal

Az ábra bal oldalán látható sematikus rajzok jelölik azt a sejtszintet, amit a képek reprezentálnak. Zöld színnel az indirekt immunfluoreszenciával (DR4 receptor elleni primer antitest + Alexa Fluor 488 GAMIG Fab) jelölt sejtfelszíni TRAIL receptorklaszterek, kék színnel a direkten jelölt (Alexa Fluor 647 konjugált koleratoxin-B) lipid-tutajok vannak prezentálva HCT-116 vastagbél tumor sejtvonalon. Az átfedő képen látható, hogy a két szín egymásra vetül és így összegzett színként a türkiz jelenik meg. Eszerint a receptorklaszterek és a lipid raftok egymással kolokalizálódnak. A felvételek azonos beállításokkal készültek, $40\times$ -es objektívvel. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron. A látótér területe: 14,6 µm × 14,6 µm.

Megfigyelésünk alapján feltételeztük, hogy az LA-12 és a ciszplatin által indukált

extrinsic apoptótikus útvonal szabályozásában a plazmamembránnak fontos szerepe lehet.

6.2.2. A platinaszármazékok fokozzák a TRAIL receptorok expressziós szintjét a vizsgált tumorsejt-vonalakban

Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy mind az 1 órás 10 μM-os ciszplatin (cDDP), mind az 1 órás 0,5 μM-os LA-12 kezelés fokozta a TRAIL receptorok expresszióját a vizsgált tumorsejt-vonalakon (*17.ábra*). Konfokális mikroszkópiás vizsgálataink azt mutatták, hogy míg a kezeletlen sejtek felszínén (*17. ábra, A kép*) kevés, halványan jelölt receptorklaszter azonosítható, addig ciszplatin kezelést követően mind a membránban mért receptorklaszterek száma, mind azok fluoreszencia intenzitása emelkedett (*17. ábra, B kép*).



<u>17. Ábra: A platinaszármazékok fokozzák a membrán TRAIL receptor expresszióját</u> A konfokális felvételek PC-3 prosztata karcinóma sejtvonalon reprezentálják a DR5 TRAIL receptor (zöld) membránra lokalizált expresszióját. Míg kezeletlen sejtek felszínén (**A** kép) kevés, halványan jelölt receptorklaszter azonosítható, addig 1h időtartamú 10 μ M koncentrációjú ciszplatin kezelést követően mind a receptorklaszterek száma, mind azok intenzitása megnőtt (**B** kép). A felvételek azonos beállításokkal készültek, 40×-es objektívvel. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron. A látótér területe: 14,6 μ m × 14,6 μ m. Eredményeinket a háttérintenzitás feletti pixelek számának meghatározásával kvantitáltuk. A **C** diagram a HCT-116, a **D** diagram a PC-3 sejtvonal DR4 és DR5 receptorainak fluoreszcencia intenzitásait mutatja 10 μ M cDDp (**sárga oszlopok**) és 0,5 μ M LA-12 kezelést követően (**kék oszlopok**) a kezeletlen kontroll (**piros oszlopok**) értékekre normálva. Az oszlopok három független kísérlet (3x20 sejt) átlagát (± SEM) ábrázolják.

Eredményeinket digitális képelemző algoritmussal, a háttérintenzitás feletti pixelek számának meghatározásával kvantitáltuk és a kontroll sejtek átlagos fluoreszencia intenzitásához képest ábrázoltuk. Megállapítottuk, hogy mindkét vizsgált sejtvonal esetén a DR4 és DR5 receptorok expressziója megnőtt a kezeléseket követően. A kontrollhoz képest jelzett változás mértéke 20-200%-os volt (*17. ábra, C és D*). Kiugró expressziós szint emelkedést okozott a cDDP kezelés a HCT-116-os sejtvonal DR5 TRAIL receptora esetén (*17. ábra, C diagram, DR5, sárga oszlop*), illetve az LA-12 kezelés a PC-3 sejtvonal DR4 TRAIL receptoránál (*17. ábra, D diagram, DR4, kék oszlop*). A statisztikai összehasonlítást Kruskal-Wallis nonparametrikus ANOVA próbával végeztük el. A HCT-116-os sejtvonalon a TRAIL receptor 1- es típusán a 10µM cDDp kezelés, a PC-3 sejtvonalon a TRAIL receptor 1-

6.2.3. A DR4 és DR5 receptorok lipid-tutaj lokalizációja nő a platina származékokkal történt kezeléseket követően

Ahhoz, hogy következtethessünk a platinaszármazékok sejtmembránra gyakorolt hatására, a sejtek DR4 és DR5 receptorait indirekt immunfluoreszenciával, a raftokat Alexa Fluor 647 konjugált koleratoxin-B alegységgel direkten jelöltük meg. A kolokalizáció mértékét a Pearson-féle keresztkorrelációs koefficiens meghatározásával kvantitáltuk. Megállapítottuk, hogy mindkét vizsgált sejtvonalon a DR4 és DR5 TRAIL receptorok kolokalizálódnak a membrán GM1 gazdag területeivel (*18. ábra A; B; C képek*).



<u>18. Ábra: Platinakezelések hatása a TRAIL receptorok raft lokalizációjára</u> 1 óra időtartamú 10 µM-os ciszplatin és 0.5 µM-os LA-12 kezelések fokozták a DR4 és DR5 TRAIL receptorok (**A; B; C zöld szín**) kolokalizációját a sejtmembrán GM1 gazdag doménjeivel (**A; B; C kék szín**) mind a HCT-116 (**A; B; C** képek és **D** ábra), mind a PC-3 (**E** ábra) sejtvonalakon. Az oszlopok három független kísérlet (3x20 sejt) átlagát (± SEM) ábrázolják. A felvételek azonos beállításokkal készültek, 40×-es objektívvel. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron. A látótér területe: 14,6 µm × 14,6 µm.

Mind az 1 órás ciszplatin, mind az LA-12 kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a TRAIL receptorok raft lokalizációja a HCT-116 (*18. ábra D diagram*) és a PC-3 (*17. ábra E diagram*) sejtvonalakon fokozódott. A statisztikai összehasonlítást ANOVA próbát követő Tukey teszttel végeztük el. Mindkét sejtvonal 1-es típusú TRAIL receptorán a 0,5 μM LA-12 kezelés, illetve a TRAIL receptor 2-es típusán mindkét kezelés szignifikánsan hatásosnak bizonyult (p<0,05).

6.2.4. A DR4 és DR5 receptorok lipid-tutaj lokalizációját rövid időtartamú TRAIL kezelés fokozza

Vizsgáltuk TRAIL ligandummal végzett aktiválás hatását a DR4, illetve DR5 receptorok raft lokalizációjára. Megállapítottuk, hogy rövid időtartamú (5-20 perces) 5 ng/ml koncentrációjú TRAIL stimulálás fokozta a receptorok raft lokalizációját mindkét vizsgált sejtvonal DR4 és DR5 receptorai esetén (*19. ábra A; B képek, C és D diagramok*).



<u>19. Ábra:Különböző időtartamú TRAIL kezelések hatása a receptorok raft</u> lokalizációjára

Rövid időtartamú (5-20 perc) 5 ng/ml koncentrációjú TRAIL ligandummal végzett aktiválás (sárga és kék oszlopok) fokozta a DR4 és DR5 TRAIL receptorok (A; B zöld szín) kolokalizációját a sejtmembrán GM1 gazdag doménjeivel (A; B kék szín) mind a PC-3 (A; B; képek és D ábra), mind a HCT-116 (C ábra) sejtvonalakon. A konfokális felvételek (A; B) egy-egy sejt felső membrán szeletéről azonos beállításokkal készültek, $40\times$ -es objektívvel. Az optikai szeletvastagság 1,5 mikron, a látótér területe: 14,6 µm × 14,6 µm. Az oszlopok három független kísérlet (3x 15 sejt) átlagát (± SEM) ábrázolják.

1 órás kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a TRAIL receptorok raft lokalizációja a HCT-116 (19. ábra C diagram) és a PC-3 (19. ábra D diagram) sejtvonalakon az alapszint alá csökkent. A statisztikai összehasonlítást kétutas ANOVA teszttel végeztük. A keresztkorrelációs koefficiens mind a TRAIL receptor 1-es, mind a 2-es típusa esetén szignifikánsan emelkedett 20 perces TRAIL ligand kezelést követően (p<0,05). Egy óra időtartamú kezelés az átfedést szignifikánsan csökkentette (p<0,05).

6.2.5. Az LA-12-vagy a ciszplatin által közvetített TRAIL-indukált citotoxicitás az apoptótikus kaszpáz kaszkád aktiválásán keresztül valósul meg

Annak érdekében, hogy feltárhassuk a platina származékok által kiváltott citotoxicitás molekuláris alapját, Western blot analízissel vizsgáltuk a kaszpáz kaszkád kialakításában részt vevő kaszpáz-8 és kaszpáz-3 mennyiségének és degradációjának változását a különböző kombinációban alkalmazott kezeléseket követően. Megállapítottuk, hogy HCT-116 sejtvonal esetén (20. ábra, HCT-116 oldal) ciszplatin, vagy LA-12 előkezelést követően alkalmazott TRAIL ligandummal végzett aktiválás aktiválta a kaszpáz kaszkádot. TRAIL liganddal, vagy platina komplexszel önállóan kezelt HCT-116 sejtekben ilyen hatást nem tapasztaltunk.



20. Ábra: Az LA-12-és a ciszplatin kezelés hatása az apoptótikus kaszpáz kaszkád aktiválására

Szubtoxikus koncentrációban alkalmazva a ciszplatint és az LA-12-t a kaszpáz-8 és -3 fehérjék nagyfokú degradációja figyelhető meg TRAIL indukciót követően mind a HCT-116, mind a PC-3 sejtvonalakban. A HCT-116 és a PC-3 sejteket LA-12-vel (0.5 μ M) vagy ciszplatinnal (10 μ M) kezeltük elő a stimulálást megelőző 24 órában. A TRAIL (5 ng/ml) ligandummal végzett stimulálás időtartama 4 h volt. *Eva Blanarova mérése*.

A pro-kaszpáz-8 és -3 fehérjék hasításának hasonló mértékű növekedése megfigyelhető volt a PC-3 sejtvonal esetén is (20. ábra PC3 oldal), azonban itt TRAIL ligandummal végzett aktiválás önmagában is hatásosnak bizonyult.

7. Következtetések

7.1. A PDGFR β lipid-tutaj- és konfluenciafüggő szabályozása glioblasztóma sejtvonalakon

Az idegrendszer glia eredetű tumoraiban a tirozinkináz aktivitású PDGF receptorok (PDGFR) fontos szerepet játszanak a tumorsejtek proliferációjábanés túlélésében. Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a sejtek felszínén a PDGF receptorok szubmikron méretű klaszteres elrendeződést mutatnak, ahol a klaszterek száma és receptor tartalma, továbbá a receptorok raftbeli lokalizációja a sejtek konfluenciájával arányosan nő. Emellett megállapítottuk, hogy a PDGFR β specifikus tirozin reziduumairól kiinduló jelátviteli útvonalak aktiváltsága függ a receptorok raftokhoz való asszociációjától valamint a sejtkultúra konfluenciájától. PDGF-BB stimulációt követően a Ras-MAPK útvonalra specifikus Tyr716-os, illetve a PI3-kináz / Akt útvonalra specifikus Tyr751 foszforiláltsági állapota ritka sejtekben megnőtt, míg a MAPK útvonalat a Ras-GAP fehérje aktiválásán keresztül gátló Tyr771-es foszforilációja csökkent. Ezzel összhangban ritka kultúrák PDGF stimulusra lényegesen nagyobb MAPK foszforilációt, magasabb arányú Ki-67 proliferációs antigén pozitivitást, és proliferációs rátát mutattak. Ugyanakkor a foszfolipáz-C -y / PKC útvonalra specifikus Tyr1021 aktiváltsága a konfluens kulturákban volt magasabb, ugyanitt a RhoA foszforiláció és a cortactin vezető széleken történő feldúsulása is sokkal jelentősebb volt, és a köztes PKC aktivációhoz szükséges, PLC-y mediált kétfázisú kalciumválasz is megjelent. A PDGF stimulus által kiváltott tirozin foszforiláció a reziduumtól függetlenül dominánsan a GM1 pozitív lipid doménekben következett be.

Az ismertetett kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával kapott eredményeink, illetve a Western blot fehérjeanalízis alátámasztják munkacsoportunk azon korábbi eredményét, miszerint a glioblasztóma sejtek szignáltranszdukciós folyamatai a sejtek konfluenciájától, azok egymással való érintkezésétől valamilyen mértékben és úton függenek. Munkacsoportunk és mások korábbi eredményei alapján feltételezhetjük, hogy a raftokban kolokalizálódó membránfehérjék nagyobb hatékonysággal képesek részt venni a sejtek jelátviteli folyamataiban. Megállapítottuk, hogy a pMAPK függő proliferációs útvonalak elsősorban a ritka, míg a PLC-gamma mediált kétfázisú kalciumválasz és a PKC-függő RhoA aktiváció a konfluens kultúrákban volt kifejezett. Eredményeink szerint ugyanazon stimulus konfluencia- és lipid-tutaj függő szabályozó mechanizmusokon keresztül eltérő irányban képes befolyásolni olyan jelentős jelátviteli kimeneteket, mint a sejtosztódás, túlélés, illetve a sejtmigráció (21. ábra).



21. Ábra: A PDGF receptor β típusának jelátviteli kimenetei

A irodalomban számos publikáció foglalkozik a PDGF receptorok ligandkötés hatására bekövetkező aktiválódásával, illetve az ezt követően elinduló jelátviteli útvonalak leírásával (90). Tudjuk azt is, hogy ezen útvonalak kontrollálatlan aktivációja sejtproliferációhoz, daganatképződéshez, illetve a tumor malignitásának fokozódásához vezet

(91). Az utóbbi évek eredményei rávilágítanak arra, hogy a receptor inaktiválódásának illetve downregulációjának kóros megváltozása hasonló jelentőséggel bírhat (92). Ismert, hogy a PDGF receptorok downregulációja két szinten szabályzott. A rövid távú hatás során a receptorok ligandkötést követően klatrin-burkos vezikulumokban internalizálódnak (93). A downreguláció szabályzásának hosszabb igénylő mechanizmusában egy időt az internalizálódott receptorok ubiquitin függő proteolízise történik, amit egy ubiquitin-ligáz, a c-Cbl katalizál (93). Mindkét szintű regulációs mechanizmusban részt vesznek a foszfotirozin foszfatázok (94, 95), de azok működésének konfluenciafüggése még nem tisztázott. Mivel a receptorok ligandkötést követő transzfoszforilációja feltehetőleg nem lehet reziduumspecifikus, úgy véljük, az általunk tapasztalt szelektív foszforiláció hátterében a foszfatázok konfluenciafüggő működése állhat, mely ligand stimulus által is szabályozott. Ezt alátámasztani látszik, hogy stimulus hiányában a lipid-tutajokon belül általános defoszforilációt mértünk, míg ligandkötést követően ugyanezekben a lipid-raftokban – ahol a receptorok nagy denzitásban gyűltek össze – tapasztaltunk erős szelektív foszforilációt. Emiatt további vizsgálataink előterébe a PTPN1, PTPN4, és PTPN11 foszfatázok konfluenciafüggő, lipid-tutajokhoz köthető expressziós és lokalizációs szabályozása kerül, tekintve, hogy ezek szerepe merült fel a PDGFR defoszforilációjában (96, 97).

7.2. Platina alapú kemoterápiás szerek és a TRAIL raftfüggő szinergizmusa a DR4 és DR5 mediált, kaszpáz-8 dependens apoptózis indukciójában

A TNF családba tartozó TRAIL ligand — más rákellenes szerekkel együttműködve — számos tumor sejtféleség esetén sejthalált idéz elő, illetve módosítja azok kemoterapeutikumokkal szemben mutatott rezisztenciáját. A ligand két receptorán keresztül (DR4/TRAIL-R1 és DR5/TRAIL-R2) képes a sejtek apoptózisához vezető jelátviteli

59

útvonalakat generálni. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a HCT-116 jelű colon- és PC3 jelű prosztata sejtvonalakon a különböző típusú TRAIL receptorok (DR4 és DR5) sejtfelszíni expressziós szintjét, valamint ezek kolokalizációját a sejtfelszín GM1 gazdag lipid doménjeivel. Vizsgáltuk továbbá, hogy előzetes ciszplatin (cDDP) és ezt követő különböző időtartamú TRAIL stimulálás miként befolyásolja a receptorok expressziós szintjét és kolokalizációját a lipid-tutajokkal. Eredményeink azt mutatták, hogy ciszplatin és LA12 kezelés hatására mind a prosztata, mind a colon sejtvonal esetén a DR5 receptor sejtfelszíni expressziója fokozódott. A TRAIL stimulálás — függetlenül a ciszplatin előkezeléstől — időfüggő módon befolyásolta a TRAIL receptorok membrán expresszióját és raftbeli lokalizációját. 5-20 percig tartó TRAIL kezelés fokozta a receptorok expressziós szintjét és azok kolokalizációját a lipid doménekkel. Egy órás ligandummal végzett aktiválást követően a kolokalizáció az alapszint alá csökkent, feltehetően a receptor internalizációja miatt.



22. Ábra: A TRAIL receptor jelátviteli kimenetei

A cDDP és a TRAIL együttes hatására a rendszerben egyszerre figyelhető meg a ciszplatin és a TRAIL receptorokat raftba lokalizáló, valamint a TRAIL kezelés receptor

internalizációt fokozó hatása. A kombinált hatás eredménye fokozott apoptózis, mely felveti a sikeres klinikai alkalmazás lehetőségét.

8. Összefoglalás

Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a sejtmembrán koleszterolban és gangliozidban gazdag lipid mikrodoménjei, az úgynevezett lipid-tutajok mindkét vizsgált rendszerben fontos szervezői a különböző céllal lejátszódó jelátviteli folyamatoknak.

A PDGF receptor β vizsgálata során kiderült, hogy ugyanazon növekedési faktor és receptora, lipid-raft platform igénybevételével, a sejtkultúra konfluenciájától függően eltérő és adekvát irányokban képes befolyásolni a jelentős jelátviteli kimeneteket. A sejtosztódást fokozó jelpályák a ritka sejtkultúrákban aktiválódnak, míg a konfluens kultúrákban a migrációt fokozó molekulák aktiválódnak. Ugyanakkor a túlélést segítő útvonalak szabályozása kevésbé divergens.

Megfigyeltük, hogy a kemoterápiában használt ciszplatin vegyületek egyik lehetséges hatásmechanizmusa a sejthalálhoz vezető TRAIL receptorok sejtfelszíni expressziójának és lipid-tutajbeli lokalizációjának fokozása. Mindkét hatás a receptorról kiinduló jelátvitel hatékonyságának növekedéséhez, és fokozott sejthalálhoz vezethet. Ez a lipid-raftokhoz kapcsolódó szabályozási folyamat potenciálisan tumor terápiás jelentőséggel bír.

Eredményeink a klinikumig terjedő áttekintő képet adnak a membrán GM1 gangliozidban gazdag mikrodoménjeinek intracelluláris jelátviteli folyamatokban betöltött szerteágazó irányító és szabályozó funkciójáról.

62

9. Summary

Cumulatively, our observations suggest that cholesterol and ganglioside enriched lipid microdomains of the cell membrane, also termed lipid rafts, are important regulators of various signaling processes.

We have shown that PDGF and its receptor, using the organizing ability of lipid raft platforms, can initiate divergent signaling pathways as required by the sparse or confluent state of the cell population. Proliferation is activated is sparse, while migration in confluent cultures. Cell survival is regulated in a less divergent manner.

We observed that platinum complexes widely used for cytostatic therapy increased the cell surface expression of TRAIL receptors and also their raft localization. Both of these effects result in a more effective signaling and increased apoptotic cell death. This newly observed lipid-raft dependent regulation has potential consequences in cancer therapy.

Our results give an overview extending to clinical aspects about the diverse regulatory and organizing function of GM1 ganglioside rich membrane microdomains.

10. Referenciák

- 1. Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science 175*, 720-731.
- 2. Phillips, M. C., Ladbrooke, B. D., and Chapman, D. (1970) Molecular interactions in mixed lecithin systems, *Biochimica et biophysica acta 196*, 35-44.
- 3. Gebhardt, C., Gruler, H., and Sackmann, E. (1977) On domain structure and local curvature in lipid bilayers and biological membranes, *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences 32*, 581-596.
- 4. Marcelja, S. (1976) Lipid-mediated protein interaction in membranes, *Biochimica et biophysica acta 455*, 1-7.
- 5. Mouritsen, O. G., and Bloom, M. (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes, *Biophysical journal* 46, 141-153.
- 6. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature 387*, 569-572.
- 7. Brown, D. A., and London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes, *The Journal of membrane biology 164*, 103-114.
- 8. Horejsi, V., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., and Drbal, K. (1998) Signal transduction in leucocytes via GPI-anchored proteins: an experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function?, *Immunology letters* 63, 63-73.
- 9. Ilangumaran, S., and Hoessli, D. C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane, *The Biochemical journal 335 (Pt 2)*, 433-440.
- 10. Moran, M., and Miceli, M. C. (1998) Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation, *Immunity* 9, 787-796.
- 11. Brdicka, T., Cerny, J., and Horejsi, V. (1998) T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains, *Biochemical and biophysical research communications* 248, 356-360.
- 12. Horejsi, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., and Stockinger, H. (1999) GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors, *Immunology today 20*, 356-361.
- 13. Resh, M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins, *Biochimica et biophysica acta 1451*, 1-16.
- 14. Baron, W., Decker, L., Colognato, H., and ffrench-Constant, C. (2003) Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains, *Current biology : CB 13*, 151-155.
- 15. Levental, I., Grzybek, M., and Simons, K. (2010) Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts, *Biochemistry* 49, 6305-6316.
- 16. Brown, D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals, *Physiology 21*, 430-439.
- 17. Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R. S., Kondo, J., and Fujiwara, T. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-

molecule tracking of membrane molecules, Annual review of biophysics and biomolecular structure 34, 351-378.

- 18. Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100*, 8053-8058.
- 19. Horejsi, V., Zhang, W., and Schraven, B. (2004) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling, *Nature reviews. Immunology 4*, 603-616.
- 20. Vereb, G., Matko, J., Vamosi, G., Ibrahim, S. M., Magyar, E., Varga, S., Szollosi, J., Jenei, A., Gaspar, R., Jr., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S. (2000) Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6013-6018.
- 21. Kawasaki, K., Yin, J. J., Subczynski, W. K., Hyde, J. S., and Kusumi, A. (2001) Pulse EPR detection of lipid exchange between protein-rich raft and bulk domains in the membrane: methodology development and its application to studies of influenza viral membrane, *Biophysical journal 80*, 738-748.
- 22. Kellner, R. R., Baier, C. J., Willig, K. I., Hell, S. W., and Barrantes, F. J. (2007) Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy, *Neuroscience 144*, 135-143.
- 23. Nagy, P., Vereb, G., Sebestyen, Z., Horvath, G., Lockett, S. J., Damjanovich, S., Park, J. W., Jovin, T. M., and Szollosi, J. (2002) Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2, *Journal of cell science 115*, 4251-4262.
- 24. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components, *The Journal of cell biology 141*, 929-942.
- 25. Brown, D. A., and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts, *The Journal of biological chemistry* 275, 17221-17224.
- 26. Heldin, C. H., and Westermark, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor, *Physiological reviews* 79, 1283-1316.
- 27. Ren, H., Yang, B. F., and Rainov, N. G. (2007) Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets in malignant glioma, *Reviews on recent clinical trials* 2, 87-101.
- 28. Kohler, N., and Lipton, A. (1974) Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity, *Experimental cell research* 87, 297-301.
- 29. Westermark, B., and Wasteson, A. (1976) A platelet factor stimulating human normal glial cells, *Experimental cell research* 98, 170-174.
- 30. Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., and Wasteson, A. (1982) Plateletderived growth factor: identification of constituent polypeptide chains, *Biochemical and biophysical research communications 104*, 66-74.
- Li, X., Ponten, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Backstrom, G., Hellstrom, M., Bostrom, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C. H., Alitalo, K., Ostman, A., and Eriksson, U. (2000) PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor, *Nature cell biology* 2, 302-309.
- LaRochelle, W. J., Jeffers, M., McDonald, W. F., Chillakuru, R. A., Giese, N. A., Lokker, N. A., Sullivan, C., Boldog, F. L., Yang, M., Vernet, C., Burgess, C. E., Fernandes, E., Deegler, L. L., Rittman, B., Shimkets, J., Shimkets, R. A., Rothberg, J. M., and Lichenstein, H. S. (2001) PDGF-D, a new protease-activated growth factor, *Nature cell biology 3*, 517-521.

- 33. Heldin, C. H., Ostman, A., and Ronnstrand, L. (1998) Signal transduction via plateletderived growth factor receptors, *Biochimica et biophysica acta 1378*, F79-113.
- 34. Ekman, S., Thuresson, E. R., Heldin, C. H., and Ronnstrand, L. (1999) Increased mitogenicity of an alphabeta heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding, *Oncogene 18*, 2481-2488.
- 35. Harvey, A. K., Stack, S. T., and Chandrasekhar, S. (1993) Differential modulation of degradative and repair responses of interleukin-1-treated chondrocytes by plateletderived growth factor, *The Biochemical journal 292 (Pt 1)*, 129-136.
- 36. He, Y., Cai, W., Wang, L., and Chen, P. (2009) A developmental study on the expression of PDGFalphaR immunoreactive cells in the brain of postnatal rats, *Neuroscience research 65*, 272-279.
- 37. Lindner, V., Giachelli, C. M., Schwartz, S. M., and Reidy, M. A. (1995) A subpopulation of smooth muscle cells in injured rat arteries expresses platelet-derived growth factor-B chain mRNA, *Circulation research 76*, 951-957.
- 38. Nister, M., Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Heldin, C. H., and Westermark, B. (1991) Differential expression of platelet-derived growth factor receptors in human malignant glioma cell lines, *The Journal of biological chemistry* 266, 16755-16763.
- 39. Smith, D., Shimamura, T., Barbera, S., and Bejcek, B. E. (2008) NF-kappaB controls growth of glioblastomas/astrocytomas, *Molecular and cellular biochemistry 307*, 141-147.
- 40. Majumdar, K., Radotra, B. D., Vasishta, R. K., and Pathak, A. (2009) Platelet-derived growth factor expression correlates with tumor grade and proliferative activity in human oligodendrogliomas, *Surgical neurology* 72, 54-60.
- 41. Kazlauskas, A., and Cooper, J. A. (1989) Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins, *Cell* 58, 1121-1133.
- 42. Wardega, P., Heldin, C. H., and Lennartsson, J. (2010) Mutation of tyrosine residue 857 in the PDGF beta-receptor affects cell proliferation but not migration, *Cellular signalling 22*, 1363-1368.
- 43. Arvidsson, A. K., Rupp, E., Nanberg, E., Downward, J., Ronnstrand, L., Wennstrom, S., Schlessinger, J., Heldin, C. H., and Claesson-Welsh, L. (1994) Tyr-716 in the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase insert is involved in GRB2 binding and Ras activation, *Molecular and cellular biology 14*, 6715-6726.
- 44. Venkatesan, B., Ghosh-Choudhury, N., Das, F., Mahimainathan, L., Kamat, A., Kasinath, B. S., Abboud, H. E., and Choudhury, G. G. (2008) Resveratrol inhibits PDGF receptor mitogenic signaling in mesangial cells: role of PTP1B, *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 22, 3469-3482.
- 45. Kashishian, A., Kazlauskas, A., and Cooper, J. A. (1992) Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PI3 kinase in vivo, *The EMBO journal 11*, 1373-1382.
- 46. Ekman, S., Kallin, A., Engstrom, U., Heldin, C. H., and Ronnstrand, L. (2002) SHP-2 is involved in heterodimer specific loss of phosphorylation of Tyr771 in the PDGF beta-receptor, *Oncogene 21*, 1870-1875.
- 47. Courtneidge, S. A., Kypta, R. M., Cooper, J. A., and Kazlauskas, A. (1991) Plateletderived growth factor receptor sequences important for binding of src family tyrosine kinases, *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research 2*, 483-486.
- 48. Valius, M., and Kazlauskas, A. (1993) Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal, *Cell* 73, 321-334.

- 49. Kundra, V., Escobedo, J. A., Kazlauskas, A., Kim, H. K., Rhee, S. G., Williams, L. T., and Zetter, B. R. (1994) Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta, *Nature 367*, 474-476.
- 50. Rhee, S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C, *Annual review of biochemistry* 70, 281-312.
- 51. Reddi, A. L., Ying, G., Duan, L., Chen, G., Dimri, M., Douillard, P., Druker, B. J., Naramura, M., Band, V., and Band, H. (2007) Binding of Cbl to a phospholipase Cgamma1-docking site on platelet-derived growth factor receptor beta provides a dual mechanism of negative regulation, *The Journal of biological chemistry* 282, 29336-29347.
- 52. Thodeti, C. K., Massoumi, R., Bindslev, L., and Sjolander, A. (2002) Leukotriene D4 induces association of active RhoA with phospholipase C-gamma1 in intestinal epithelial cells, *The Biochemical journal 365*, 157-163.
- 53. Fisher, H. W., and Yeh, J. (1967) Contact inhibition in colony formation, *Science 155*, 581-582.
- 54. Thiery, J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nature reviews. Cancer* 2, 442-454.
- 55. Fiaschi, T., Chiarugi, P., Buricchi, F., Giannoni, E., Taddei, M. L., Talini, D., Cozzi, G., Zecchi-Orlandini, S., Raugei, G., and Ramponi, G. (2001) Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation, *The Journal of biological chemistry* 276, 49156-49163.
- 56. Vereb, G., Feuerstein, B. G., Hyun, W. C., Fulwyler, M. J., Balazs, M., and Szollosi, J. (2005) Biphasic calcium response of platelet-derived growth factor stimulated glioblastoma cells is a function of cell confluence, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 67, 172-179.
- 57. Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2005) Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors, *Cytokine & growth factor reviews 16*, 55-76.
- 58. Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand in vivo, *Nature medicine* 5, 157-163.
- 59. Koschny, R., Walczak, H., and Ganten, T. M. (2007) The promise of TRAIL-potential and risks of a novel anticancer therapy, *Journal of molecular medicine* 85, 923-935.
- Makhov, P., Golovine, K., Uzzo, R. G., Rothman, J., Crispen, P. L., Shaw, T., Scoll, B. J., and Kolenko, V. M. (2008) Zinc chelation induces rapid depletion of the Xlinked inhibitor of apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis, *Cell death and differentiation 15*, 1745-1751.
- 61. Ndozangue-Touriguine, O., Sebbagh, M., Merino, D., Micheau, O., Bertoglio, J., and Breard, J. (2008) A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma, *Oncogene* 27, 6012-6022.
- 62. MacFarlane, M., Kohlhaas, S. L., Sutcliffe, M. J., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. (2005) TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies, *Cancer research* 65, 11265-11270.
- 63. Kelley, R. F., Totpal, K., Lindstrom, S. H., Mathieu, M., Billeci, K., Deforge, L., Pai, R., Hymowitz, S. G., and Ashkenazi, A. (2005) Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling, *The Journal of biological chemistry* 280, 2205-2212.

- 64. Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors, *Science 277*, 818-821.
- 65. Zhang, X. D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T., and Hersey, P. (1999) Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICEinhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma, *Cancer research* 59, 2747-2753.
- 66. Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells, *The Journal of biological chemistry* 274, 22532-22538.
- 67. Li, S., Zhao, Y., He, X., Kim, T. H., Kuharsky, D. K., Rabinowich, H., Chen, J., Du, C., and Yin, X. M. (2002) Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis, *The Journal of biological chemistry* 277, 26912-26920.
- 68. Wajant, H. (2004) TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship, *Vitamins and hormones* 67, 101-132.
- 69. Song, J. H., Tse, M. C., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N. M., and Hao, C. (2007) Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells, *Cancer research* 67, 6946-6955.
- 70. Eramo, A., Sargiacomo, M., Ricci-Vitiani, L., Todaro, M., Stassi, G., Messina, C. G., Parolini, I., Lotti, F., Sette, G., Peschle, C., and De Maria, R. (2004) CD95 deathinducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells, *European journal of immunology 34*, 1930-1940.
- 71. Kondo, K., Yamasaki, S., Sugie, T., Teratani, N., Kan, T., Imamura, M., and Shimada, Y. (2006) Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma, *International journal of cancer. Journal international du cancer 118*, 230-242.
- 72. Psahoulia, F. H., Drosopoulos, K. G., Doubravska, L., Andera, L., and Pintzas, A. (2007) Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts, *Molecular cancer therapeutics* 6, 2591-2599.
- 73. Xu, L., Qu, X., Zhang, Y., Hu, X., Yang, X., Hou, K., Teng, Y., Zhang, J., Sada, K., and Liu, Y. (2009) Oxaliplatin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by CBL-regulated death receptor redistribution in lipid rafts, *FEBS letters* 583, 943-948.
- Ganten, T. M., Haas, T. L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M. R., Fas, S. C., Krueger, A., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2004) Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs, *Cell death and differentiation 11 Suppl 1*, S86-96.
- 75. Sudhakar, C., Jain, N., and Swarup, G. (2008) Sp1-like sequences mediate human caspase-3 promoter activation by p73 and cisplatin, *The FEBS journal 275*, 2200-2213.
- 76. Horvath, V., Soucek, K., Svihalkova-Sindlerova, L., Vondracek, J., Blanarova, O., Hofmanova, J., Sova, P., and Kozubik, A. (2007) Different cell cycle modulation

following treatment of human ovarian carcinoma cells with a new platinum(IV) complex vs cisplatin, *Investigational new drugs 25*, 435-443.

- 77. Roubalova, E., Kvardova, V., Hrstka, R., Borilova, S., Michalova, E., Dubska, L., Muller, P., Sova, P., and Vojtesek, B. (2010) The effect of cellular environment and p53 status on the mode of action of the platinum derivative LA-12, *Investigational new drugs* 28, 445-453.
- 78. Sova, P., Mistr, A., Kroutil, A., Zak, F., Pouckova, P., and Zadinova, M. (2006) Comparative anti-tumor efficacy of two orally administered platinum(IV) drugs in nude mice bearing human tumor xenografts, *Anti-cancer drugs 17*, 201-206.
- 79. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature methods 9*, 671-675.
- Schonk, D. M., Kuijpers, H. J., van Drunen, E., van Dalen, C. H., Geurts van Kessel, A. H., Verheijen, R., and Ramaekers, F. C. (1989) Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10, *Human genetics* 83, 297-299.
- 81. Bullwinkel, J., Baron-Luhr, B., Ludemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006) Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells, *Journal of cellular physiology 206*, 624-635.
- 82. Rahmanzadeh, R., Huttmann, G., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2007) Chromophoreassisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis, *Cell proliferation* 40, 422-430.
- 83. Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown, *Journal of cellular physiology 182*, 311-322.
- 84. Wang, Y., Wang, X., Zhang, J., Sun, G., Luo, H., Kang, C., Pu, P., Jiang, T., Liu, N., and You, Y. (2012) MicroRNAs involved in the EGFR/PTEN/AKT pathway in gliomas, *Journal of neuro-oncology 106*, 217-224.
- 85. Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back, *Science 302*, 1704-1709.
- 86. Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2011) Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors, *Nature reviews. Cancer 11*, 609-618.
- 87. Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L. S., and Cheng, H. (2009) Calcium flickers steer cell migration, *Nature* 457, 901-905.
- 88. Weed, S. A., Du, Y., and Parsons, J. T. (1998) Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1, *Journal of cell science 111 (Pt 16)*, 2433-2443.
- 89. Kim, Y. N., Choi, J. E., Bae, J. S., Jang, K. Y., Chung, M. J., Moon, W. S., Kang, M. J., Lee, D. G., and Park, H. S. (2012) Expression of cortactin and focal adhesion kinase in colorectal adenocarcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and their prognostic implication, *Korean journal of pathology 46*, 454-462.
- 90. Ward, C. W., and Garrett, T. P. (2004) Structural relationships between the insulin receptor and epidermal growth factor receptor families and other proteins, *Current opinion in drug discovery & development 7*, 630-638.
- 91. Mapstone, T. B. (1991) Expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor and their correlation with cellular morphology in glial tumors, *Journal of neurosurgery* 75, 447-451.
- 92. Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, M. L., Talini, D., Doria, L., Fiaschi, T., Buricchi, F., Giannoni, E., Camici, G., Raugei, G., and Ramponi, G. (2002) New perspectives in PDGF receptor downregulation: the main role of phosphotyrosine phosphatases, *Journal of cell science 115*, 2219-2232.

- 93. Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase, *Science 286*, 309-312.
- 94. Ostman, A., and Bohmer, F. D. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases, *Trends in cell biology 11*, 258-266.
- 95. Kovalenko, M., Denner, K., Sandstrom, J., Persson, C., Gross, S., Jandt, E., Vilella, R., Bohmer, F., and Ostman, A. (2000) Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1, *The Journal of biological chemistry* 275, 16219-16226.
- 96. Dagnell, M., Frijhoff, J., Pader, I., Augsten, M., Boivin, B., Xu, J., Mandal, P. K., Tonks, N. K., Hellberg, C., Conrad, M., Arner, E. S., and Ostman, A. (2013) Selective activation of oxidized PTP1B by the thioredoxin system modulates PDGF-beta receptor tyrosine kinase signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America 110, 13398-13403.
- 97. Wu, J. H., Goswami, R., Cai, X., Exum, S. T., Huang, X., Zhang, L., Brian, L., Premont, R. T., Peppel, K., and Freedman, N. J. (2006) Regulation of the plateletderived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-5 in vascular smooth muscle cells involves the phosphatase Shp2, *The Journal of biological chemistry 281*, 37758-37772.

11. Publikációk

11.1. Közlemények

DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár



Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK/255/2015.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szöőr Árpád Neptun kód: ALEKKW Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola MTMT azonosító: 10034414

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Szöőr, Á., Ujlaky-Nagy, L., Tóth, G., Szöllősi, J., Vereb, G.: Cell confluence induces switching from proliferation to migratory signaling by site-selective phosphorylation of PDGF receptors on lipid raft platforms. *Cell. Signal. "Accepted by Publisher" (2015)* DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.11.012 IF:4.315 (2014)

 Vondalova, B.O., Jelínková, I., Szöőr, Á., Skender, B., Soucek, K., Horváth, V., Vaculova, A., Andera, L., Sova, P., Szöllősi, J., Hofmanova, J., Vereb, G., Kozubik, A.: Cisplatin and a potent platinum(IV) complex-mediated enhancement of TRAIL-induced cancer cells killing is associated with modulation of upstream events in the extrinsic apoptotic pathway. *Carcinogenesis*. *32* (1), 42-51, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgq220 IF:5.702

További Közlemények

 Govers, C., Sebestyén, Z., Roszik, J., van Brakel, M., Berrevoets, C., Szöőr, Á., Panoutsopoulou, K., Broertjes, M., Van, T., Vereb, G., Szöllősi, J., Debets, R.: TCRs genetically linked to CD28 and CD3[epszilon] do not mispair with endogenous TCR chains and mediate enhanced t cell persistence and anti-melanoma activity. *J. Immunol.* 193 (10), 5315-5326, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1302074 IF:4.922

CENI EGYETELY .

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>



DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár



4. Nagy, D., Gönczi, M., Dienes, B., Szöőr, Á., Fodor, J., Nagy, Z., Tóth, A., Fodor, T., Bai, P., Szűcs, G., Rusznák, Z., Csernoch, L.: Silencing the KCNK9 potassium channel (TASK-3) gene disturbs mitochondrial function, causes mitochondrial depolarization, and induces apoptosis of human melanoma cells. *Arch. Dermatol. Res. 306* (10), 885-902, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00403-014-1511-5. IF:1.902

 Pázmándi, K., Kumar, B.V., Szabó, K., Boldogh, I., Szöőr, Á., Vereb, G., Veres, Á., Lányi, Á., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells. *PLoS One.* 7 (12), e52085, 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052085 IF:3.73

 Roszik, J., Sebestyén, Z., Govers, C., Guri, Y., Szöőr, Á., Pályi-Krekk, Z., Vereb, G., Nagy, P., Szöllősi, J., Debets, R.: T-cell synapse formation depends on antigen recognition but not CD3 interaction: Studies with TCR : zeta, a candidate transgene for TCR gene therapy. *Eur. J. Immunol. 41* (5), 1288-1297, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940233 IF:5.103

 7. Szöőr, Á., Szöllősi, J., Vereb, G.: Rafts and the battleships of defense: The multifaceted microdomains for positive and negative signals in immune cells. *Immunol. Lett.* 130 (1-2), 2-12, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.12.016 IF:2.511

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,185 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,017

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, 2015.12.08.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>

11.2. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások, pályamunkák és poszterek

11.2.1. Elsőszerzős helyi TDK előadások:

- 1. A PDGF receptorok működésének és sejtfelszíni lokalizációjának vizsgálata glioblasztóma sejteken (2005. Debrecen, II. helyezés)
- 2. Glioblasztóma sejteken a lipid raftok a sejtkonfluencia függvényéban dinamikusan szabályozzák a PDGF receptorok interakcióit és működését (2007. Debrecen II: helyezés)
- 3. A foszfatázok lipid raft- és konfluenciafüggő módon szabályozzák a PDGF receptorokat (2008. Debrecen)

11.2.2. Elsőszerzős országos TDK előadások:

- 1. A PDGF receptorok lipid tutajbeli klaszteres lokalizációja funkcionális jelentőséggel bír (2005. Szeged III. helyezés)
- 2. Glioblasztóma sejteken a lipid raftok a sejtkonfluencia függvényéban dinamikusan szabályozzák a PDGF receptorok interakcióit és működését (2007. Budapest)

11.2.3. Elsőszerzős pályamunkák:

- 1. A PDGF receptorok lipid tutajbeli klaszteres lokalizációja funkcionális jelentőséggel bír (2006. Debrecen)
- 2. A lipid raftok a sejtkonfluencia függvényében dinamikusan szabályozzák a PDGF receptorok interakcióit és működését (2008. Debrecen)

11.2.4. Magyar nyelvű elsőszerzős előadások:

1. A PDGF receptorok lipid tutajbeli klaszteres lokalizációja funkcionális jelentőséggel bír

2006. Budapest Korányi Emlékkonferencia

2. A lipid raftok dinamikusan szabályozzák a membránfehérjék interakcióit és működését

Gyógyszertudományok Doktori Iskola Ph.D. szimpózium (2010. Debrecen)

3. A lipid raftok dinamikusan szabályozzák a PDGF receptorok interakcióit és működését

HMAA balatonfüredi diákkonferencia (2010. augusztus 20-21) győztes előadás

4. A specifikus PDGF receptor aktiváciáció konfluenciafüggésének vizsgálata konfokális mikroszkóp alapú kvantitatív citometriával *Gyógyszertudományok Doktori Iskola Ph.D. szimpózium (2011. Debrecen)*

11.2.5. Magyar nyelvű elsőszerzős poszterek:

- Glioblasztóma sejteken a lipid raftok a sejtkonfluencia függvényéban dinamikusan szabályozzák a PDGF receptorok interakcióit és működését Szöőr Árpád, Ujlaky-Nagy László, Vereb György XXXVII:Membrántranszport konferencia (2007. Sümeg)
- 2. A triozin-foszfatázok dinamikus raft-lokalizációja szabályozza a PDGF receptorok foszforiláltsági állapotát és jelátvitelét glioblasztóma sejtekben Szöőr Árpád, Ujlaky-Nagy László, Szöllősi János, Vereb György Nemzetközi Semmelweis szimpózium (2007. Budapest)
- 3. A TRAIL receptorok cisplatin kezelésre lipid raft függő módon aktiválódnak Szöőr Árpád, Karel Souček, Alois Kozubík, Szöllősi János, Vereb György MBFT (2009. Pécs)
- 4. A sejt-konfluencia lipid tutajokhoz kötötten szabályozza a sejtek PDGF növekedési faktorra adott kontextusában adekvát proliferatív, illetve migratórikus válaszát Szöőr Árpád, Szöllősi János, Vereb György VII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia (2012. Budapest)
- 5. Trastuzumab rezisztens Jimt-1 emlőtumor xenograftok kezelése ErbB2 célpontú kiméra receptorral újraprogramozott citolitikus T-limfocitákkal SCID egerekben Szöőr Árpád, Simon László, Liebrecht Valerie, Holzinger Astrid, Szöllősi János, Abken Hinrich, Vereb György Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlés (2013. Pécs)

11.2.6. Idegen nyelvű elsőszerzős poszterek:

- Raft and confluence dependent regulation of PDGFR β by tyrosine-phosphatases *Árpád Szöőr, László Ujlaky-Nagy, János Szöllősi, György Vereb ISAC Congress (2008. Budapest)*
- Cholesterol and raft dependent response of granulocytes to apoptosis modulators Árpád Szöőr, János Szöllősi, György Vereb Balatonöszöd Immune Congress in memoriam Janos Gergely (2009. Balatonöszöd)
- 3. Raft localization of Cd16 modulated by a novel immune-modulator compound Árpád Szöőr, János Szöllősi, György Vereb Tatra Immune Congress EFIS (2010. Strbske Pleso)
- 4. Raft and confluence dependent regulation of PDGFR beta signalling Árpád Szöőr, László Ujlaky-Nagy, János Szöllősi, György Vereb CYTO 2011 Congress (2011. Baltimore)
- 5. Quantitative microscopic analysis reveals cell confluence regulated divergence of PDGFR-initiated signaling pathways with logically streamlined cellular outputs Árpád Szöőr, László Ujlaky-Nagy, János Szöllősi, György Vereb EBSA 2011 (Budapest)

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Prof. Dr. Vereb György témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm szeretetét, önzetlen támogatását, nélkülözhetetlen szakmai tanácsait, amivel alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz. Köszönöm Neki dolgozatom alapos és kritikus átnézését.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Szöllősi János intézetigazgatónak aki támogatásával és tapasztalatával szintén hozzájárult eredményeim eléréséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Ujlaky-Nagy Lászlónak a kísérleti munka során nyújtott tanításáért és segítségéért.

Köszönetet mondok Dr. Tóth Gábornak a kísérletes munka során nyújtott segítségéért. Köszönöm neki a jó hangulatban eltöltött munkanapokat, a nagy beszélgetéseket és a konferenciákon együtt töltött szép napokat. Köszönöm barátságát, támogatását.

Köszönetem fejezem ki, Dr. Szilágyi Orsolyának, Lajtos Tamásnak, Dr. Kovács Tamásnak, és Bársony Orsolyának az elmúlt 5 év minden együtt töltött percéért, a barátságukért.

Köszönöm Vágóné Toldi Hajnalkának és Farkasné Sánta Gyöngyinek végtelen szeretetüket, mindennapi kedvességüket és támogatásukat.

Köszönetet mondok Pálné Terdik Tündének, Bedei Mónikának, és Kálmán-Szabó Ibolyának a munkám gyakorlati része során nyújtott segítségükért.

A munkát az OTKA K 75752, az EU FP6 LSHC-CT-2005-018914 projektek, és a Baross Gábor Program REG-EA-09-1-2009-0010 pályázata támogatta.

75

13. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai