

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A sejtmembrán mikrodomének szervező-moduláló szerepe
daganatsejtek jelátvitelében és a daganatterápiában**

Dr. Szőőr Árpád



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A sejtmembrán mikrodomének szervező-moduláló szerepe
daganatsejtek jelátvitelében és a daganatterápiában**

Dr. Szőőr Árpád

Témavezető: Dr. Vereb György



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

**A sejtmembrán mikrodomének szervező-moduláló szerepe daganatsejtek
jelátvitelében és a daganatterápiában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta:

Dr. Szőőr Árpád
általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
Farmakológia doktori programja keretében

Témavezető: Dr. Vereb György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK,
Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára
2016. április 25., 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD
Dr. Ábrahám István, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD
Dr. Ábrahám István, az MTA doktora
Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet A épület tanterme
2016. április 25., 13:00

1. Bevezetés

Az irodalomban számos publikáció mutat rá arra, hogy a sejtmembrán monosialo-tetrahexozil-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 sejtlejtani 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 sejtútvonal, 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 halálindítandó raft-függő 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. 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, 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, amelybe kisebb-nagyobb mértékben fehérjemolekulák süllyednek. A lipidek szabadabb oldalirányú elmozdulása bizonyos mértékű folyékonyságot, a fehérjemolekulák mozaikos elrendeződése és egymáshoz való kapcsolódása pedig stabilitást biztosít a membránnak. 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. 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. 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.

1997-ben Simons és Ikonen új elméletében 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 doménnek (DRM), magyarul lipid-tutajoknak. A raftok felépítésének középpontjában a koleszterin áll, emellett 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.

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, amelyek működését és interakcióit a klaszteres szerveződés befolyásolhatja. Ilyen kulcsfontosságú fehérjék például az Lck tirozinkináz, a Src családbeli kinázok, és egyes G fehérjék, továbbá integrinek.

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 fent leírt megfigyelések alapján a korábban leírt, rendezett és rendezetlen struktúrákat feltételező raft hipotézis kiegészült a dinamikus átalakulás lehetőségével. A dinamikusan strukturált mozaik modellben a fehérje–fehérje, illetve a fehérje–lipid kölcsönhatásoknak legalább akkora szerepe van, mint a rendezett vagy rendezetlen formában elrendeződő lipid doméneknek. A raftokban megvalósuló fehérje–lipid interakciók növelik a jelátviteli folyamatokhoz kapcsolódó intermolekuláris kölcsönhatások élettartamát, továbbá lehetővé teszik a sejtfelszíni receptorfehérjék kapcsolódását a kortikális aktin citoskeletonhoz, illetve egyéb citoplazmatikus adaptor- és szignál proteinekhez, ugyanakkor egyes fehérjéket el is választhatnak egymástól.

A mikroszkópos technika és az immunfluoreszcens jelölés területén bekövetkező fejlődés lehetővé tette a lipid-tutajok strukturájának és funkciójának pontosabb megfigyelését. A legújabb eredmények szerint a membrán mikrodomének mérete a néhány nanométeres lipidgyűrűktől a száz nanométernél kisebb tartományba eső szigeteken át a néhány száz nanométeres klaszterekig változhat. Bár a különböző méretű membrán mikrodomének lipid összetételüket tekintve nagy változatosságot mutatnak, a magas glikoszfinfolipid és koleszterin tartalom általánosan jellemző.

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

2.2. A lipid-tutajok szerepének vizsgálatában felhasznált molekuláris modellrendszerek

2.2.1. 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 lejátsszódásában. Másrészt, nagyszámú betegség ismert az irodalomban, amely valamilyen módon kapcsolatba hozható a PDGF, illetve receptora kóros expressziójával, és jelátvitelével. Számos kutatás irányul a PDGF, vagy receptora, terápiás támadáspontként történő felhasználására.

A PDGF-et, mint szolubilis növekedési faktort először az 1970-es években mutatták ki a vérlemezkék alfa granulumából. Már a legelső publikációk leírták, hogy a ligand nélkülözhetetlen a fibroblasztok, simaizom-, illetve glia sejtek normális működéséhez. Az 1980-as években a PDGF molekuláris szerkezetét két különböző – A, illetve B – polipeptid lánc által alkotott heterodimerként írták le, amely két gén – PDGF-A, illetve

PDGF-B – által kódoltan három fehérjét – PDGF-AA, PDGF-BB, illetve PDGF-AB – képes kialakítani. Az új évezred első évtizedében további variánsokat – a PDGF-C-t, és a PDGF-D-t – fedeztek fel.

Az A és B alegységek kovalens kapcsolataként leírt PDGF dimer hasonló dimer szerkezetű α és β láncokból felépülő PDGF receptorhoz kötődik. 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. Az α -típusú PDGF receptorok nagy fokban expresszálódnak a mezenchimális sejtek, főleg a chondrociták és oligodendrociták felszínén, míg a β -típusú PDGF receptorok megtalálhatóak a vaszkuláris simaizomsejteken, illetve nagy jelentőséggel bírnak az glia eredetű idegrendszeri tumorok szabályozásában. Utóbbi esetben a PDGF receptor expressziója jól korrelál a tumor grádusával, proliferációs aktivitásával, azaz a malignitás fokával.

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 egyvel alacsonyabb grádusba sorolt anaplasztikus asztrocitóma. A tumor rendkívüli malignitása miatt a PDGF/PDGFR mediált tumor proliferáció jelátviteli útvonalainak felderítése nagy jelentőséggel bírhat.

A PDGF receptorával kölcsönhatva képes jelátviteli útvonalakat indukálni a sejtekben. Ligandkötést követően a receptorok dimerizálódnak és a szerkezetváltozás hatására aktiválódó intrinsic tirozinkinázok foszforilálják a szabályozó szereppel bíró 857-es tirozin oldalláncát. Ezt követően kaszkádszerűen foszforilálódnak a receptor intracelluláris tirozinjai, melyek a szignáltranszdukcióban kulcsszereppel bíró Src homology 2 (SH2) doménnel rendelkező fehérjéknek biztosítanak kapcsolódási pontot. A receptor 15 intracelluláris tirozin reziduuma közül a 716-os tirozin (Y716/Tyr716) foszforilálódását 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.

A PDGF receptor intracelluláris 771-es tirozinja (Y771/ Tyr771) foszforilációját követően kötőhelyként szolgál a már korábban említett Ras-GAP számára, így a Ras-MAPK útvonalat gátolja. A 751-es tirozin (Y751/Tyr751) a receptor kináz inzert régiójában helyezkedik el és foszforilációját követően a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3-kináz) p85-ös szabályozó alegységét képes megkötni. 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. A sejtek túlélésének Akt közvetítette szabályozásán túl a PI3-kináz szignáltranszdukciós útvonal fontos szerepet játszik a sejt migráció irányításában is. A PDGF receptor 1021-es tirozinjának oldallánca (Y1021/ Tyr1021) a foszfolipáz C- γ 1 (PLC γ) SH2 doménjének a kötőhelye. A PLC γ 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). A PLC γ részt vesz a sejt migráció szabályozásában például a RhoA fehérje foszforilálásán keresztül.

Munkacsoportunk korábbi kísérleteiben megállapította, hogy glioblasztóma sejt kultúrák közül csak a konfluens, vélhetően kontakt gátlás alatt lévőek válaszolnak PDGF stimulusra komplett, kétfázisú kalcium tranzienssel. Azt is megállapítottuk, hogy a sejtek felszínén a PDGF receptorok 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 pedig csökkenti.

2.2.2. A TRAIL receptor

Napjainkban a daganatellenes terápiák legfontosabb célja, hogy szelektíven indukáljanak apoptózist a malignus sejtekben úgy, hogy ezzel párhuzamosan az egészséges sejteken nem hatnak. Az egyik ígéretes megközelítés az extrinsikus apoptotikus útvonalak indukálása a tumor nekrozis faktor szupercsaládba tartozó

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) liganddal, ami szelektíven indítja be a daganatsejtek programozott sejthalálát mind in vitro, mind in vivo. A daganatos sejtek érzékenységének és a normál sejtek rezisztenciájának a pontos hatásmechanizmusa 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. A rezisztenciához vezető molekuláris mechanizmusok vizsgálata nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a citokint biztonságosan lehessen alkalmazni tumor ellenes 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, 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.

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

Az irodalomban számos hivatkozás található a TRAIL-hez kapcsolt jelátvitel kezdeti lépéseivel, különösen a TRAIL receptor expressziójának szabályozásával, ezek sejtfelszíni transzlokációjával, membrán eloszlásával, lipid-tutaj (ko)lokalizációjával és internalizációjával kapcsolatban. A TRAIL receptorok akkumulációja a membrán GM1 gazdag lipid-tutajaiban elősegíti a DISC kialakulását és így fokozza a kaspáz-8 aktivációját, ami sejtek apoptózisához vezet. Azt is megfigyelték, hogy a TRAIL-DISC

rafton kívüli felhalmozódása gátolja a kaszpáz-8 hasítást és anti-apoptótikus szignál kialakulásához vezet.

A kemoterápiás szerek döntően befolyásolják a TRAIL indukált sejtválasz kezdeti lépéseit, például a receptorok sejtfelszíni expressziójának fokozásával, azok lipid raftokba gyűjtésével, a DISC kialakításával és a társult kaszpáz-8 aktivációval, illetve a proapoptótikus/apoptótikus molekulák fel- és leszabályozásával.

A különböző platina komplexek (például ciszplatín, carboplatin és oxaliplatin) széleskörűen alkalmazott kemoterápiás szerek a szolid tumorok kezelésében. Azáltal, hogy kovalens kötések 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. Az elmúlt két évtizedben számos újonnan szintetizált platinavegyület jelent meg a klinikai vizsgálatokban. A kísérleteinkben használt LA-12 is egy új típusú Pt(IV) adamantylamin ligandot tartalmazó komplex, ami jelenleg első fázisú klinikai kipróbálás alatt áll. In vivo kísérletekben az LA-12 daganatellenes aktivitása jóval magasabb mind a ciszplatinnal, mind a satraplatinval, egy másik Pt(IV) komplexszel összevetve, továbbá nagyobb mértékben penetrál a szövetekbe és kevésbé toxikus a szervezetre.

3. 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 tirozinkináz aktivitású PDGF receptorok (PDGFR) β típusának szabályozásában?
- Van-e szerepe a lipid-tutajoknak a platinaszármazékokkal és TRAIL receptorokon keresztül kombináltan előidézett apoptotikus válasz kialakulásában?

4. Anyagok, módszerek

4.1. A kísérletekhez használt sejtvonalak

A PDGF β receptor lipid-tutaj függő szabályozását a fehérjét expresszáló A172 és T98G jelű kitapadva növény humán glioblasztóma sejtvonalakon vizsgáltuk. A sejteket 10% FCS-el kiegészített DMEM tápoldatban, 5% CO₂-t tartalmazó párasított légtérű termosztátban, 37°C-n tenyésztettük. A konfokális mikroszkóppal végzett *in situ* mérésekhez a sejteket 12 mm-es fedőlemezek felszínére növesztettük, majd jelölés után a rárejtegetett Mowiolal tárgylemezre borítottuk.

A PDGF receptorok membránbeli mintázatának vizsgálatához a konfluens és diszperz sejteket párhuzamosan, azonos ideig növesztettük, a különbséget a kitapasztott sejtek számának megválasztásával hoztuk létre. A konfluens kultúrákhoz 6x10⁴/cm², a diszperzekhez 1,5x10⁴/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 növesztetni a kultúrákat párhuzamosan 35mm átmérőjű kis és 100mm átmérőjű nagy Petri edényekben. A kezdeti sejtszám 1,5x10⁵/cm² volt.

A platinaszármazékok hatását a TRAIL receptorok lipid-tutaj lokalizációjára HCT-116 jelű humán vastagbél eredetű adenokarcinóma, illetve PC-3 jelű IV. grádusú prosztata karcinóma sejtvonalakon vizsgáltuk. A sejteket 10% FCS-el kiegészített McCoy's 5a módosított tápoldatban, 5% CO₂-t tartalmazó párasított légtérű 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.

4.2. Glioblasztóma sejtek PDGF stimulálása

Az A172 és T98G jelű glioblasztóma sejtvonalakat PDGF-BB stimulálás előtt 120 percen keresztül indikátor- és szérumentes DMEM tápoldatban éhezettük. Közvetlenül a stimulálás előtt HEPES-el mostuk a sejteket nedves kamrában. Ezután a

sejtek felszínére 50 µl 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB oldatot pipettáztunk, majd különböző ideig inkubáltunk nedveskamrában 37°C-on. Ezt követően a sejteket jéghideg HEPES-el mostuk, így leállítva a stimulálás hatását. Western blot kísérletek esetén a stimulálást felületarányosan nagyobb térfogatú oldattal végeztük el, továbbá a lízist megelőzően a másfél órán keresztül indikátor- és szérumentes DMEM tápoldatban éheztetett sejteket 1, 2, 5, 15, 30 és 60 percig stimuláltuk 20 ng/ml koncentrációjú PDGF-BB liganddal. Kontrollként minden esetben stimulálatlan sejteket használtunk.

4.3. A vastagbél és prosztatata karcinóma sejtek kezelése TRAIL ligandummal és platinaszármazékokkal

A HCT-116 és PC3 karcinóma sejtvonalakat a kezelések előtt 120 perccel keresztül indikátor- és szérumentes DMEM tápoldatban éhezettük. 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.

4.4. Immunfluoreszcenciás jelölések

A glioblasztóma, illetve a vastagbél és prosztatata karcinóma sejtvonalakat fedőlemezekre növesztettük. Ezt követően a mintákat jégre helyezett nedveskamrába tettük, és a további lépéseket itt végeztük el. A sejteket HEPES pufferrel mostuk, majd 10 percig inkubáltuk a megfelelő monoklonális antitest telítő koncentrációjú oldatával. Ezután mosást követően a megfelelő fluoreszcens festékkel konjugált, 15 µg/ml koncentrációjú másodlagos antitesttel, illetve 4 µg/ml koncentrációjú A488-konjugált koleratoxin B alegységgel inkubáltunk. Újabb mosás után a sejteket 4 %-os frissen depolimerizált paraformaldehiddel jégen, majd szobahőn fixáltuk.

A glioblasztóma sejtek esetén a különböző jelátviteli útvonalakra specifikus Tyr716, Tyr751, Tyr771, illetve Tyr1021 foszftirozin reziduumok, a pRhoA, cortactin és Ki-67 intracelluláris jelölését közvetlenül az extracelluláris antigének jelölését követően végeztük el. A sejteket 1%-os frissen depolimerizált paraformaldehiddel fixáltuk, majd újabb 10 percen keresztül 0,1% Triton-X 100-at és 1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferrel permeabilizáltuk. Ezután a sejteket jégen, a megfelelő monoklonális antitestekkel inkubáltuk 0,05% Triton-X 100 1% BSA jelenlétében. A mintákat 0,05% Triton-X 100-at és 1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferrel mostuk, majd a sejteket 0,05% Triton-X 100-at tartalmazó, az elsődleges antitestet jelölő Alexa Fluor 546, Cy3, vagy Alexa Fluor 647 konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 0,05% Triton-X 100-at és 1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferrel mostuk. Végül a mintákat 4 %-os frissen depolimerizált paraformaldehiddel fixáltuk. A kolokalizációs kísérletek esetén mosás után 20 µl Mowiolt pipettáztunk a sejtekre, majd azokat sejtekkel lefelé buborékmentesen tárgylemezre fordítottuk.

4.5. 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 fluoresceint 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 háromszorosán jelzett minták esetében az Alexa Fluor 488 fluoreszcencia detektálására 505-550 nm-es, a Cy3 és Alexa Fluor 546 fluoreszcencia detektálására 560-615 nm-es sávszűrőt, az Alexa Fluor 647 fluoreszcencia detektálására 650 nm-es felüláteresztő emissziós szűrőt használtunk. Az 512×512 pixeles, $1,5 \mu\text{m}$ optikai vastagságú konfokális szeleteket $40\times$ víz immerziós objektívvel ($\text{NA}=1,2$) készítettük, $14,6 \times 14,6 - 29,2 \times 29,2 \mu\text{m}$ közötti méretű területekről.

4.6. Digitális képfeldolgozás

4.6.1. A kolokalizáció meghatározása a keresztkorreláció alapján

A sejtfelszíni antigének kolokalizációs párijait a kettősen jelölt sejtek konfokális képeiből a keresztkorrelációs koefficiens számolásával határoztuk meg.

Az összegzéshez csak azokat a pixeleket használtuk, melyek legalább az egyik képből 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.

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

A sejtmembrán GM1 gazdag mikrodoménjeiben a specifikus foszfortirozin reziduumok denzitásának meghatározására az alábbi digitális képelemző algoritmust használtuk.

Első lépésben mind a GM1 gazdag területeket, mind a foszfortirozint és a PDGFR-t reprezentáló csatornákat a háttérintenzitásra korrigáltuk. Ezt követően a lipid raftokat 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.

4.6.3. 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 is értékelhessük, a

4.6.2 pontban bemutatott digitális képelemző algoritmusunkat továbbfejlesztettük. Először normáltuk az egyes pixelekből mért aktivált, azaz foszforilált PDGF receptorokat jellemző intenzitást az összes receptor pixelbeli 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 45-45 sejtből kapott eredményt használtunk fel.

4.7. Statisztikai elemzés

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

A PDGFR β lipid-tutaj- és konfluenciafüggő szabályozásának vizsgálatakor a stimulált minták statisztikai összehasonlítására kétutas ANOVA próbát végeztünk, majd eredményeinket Tukey-féle post-hoc teszttel vizsgáltuk.

A platina alapú kemoterápiás szerek és a TRAIL ligand raft-függő szinergizmusának vizsgálatakor az statisztikai összehasonlítást Mann-Whitney féle U-próbával illetve kétutas ANOVA próbával végeztük el.

4.8. A tirozin foszforiláció és a jelátvitel végpontjainak vizsgálata Western blot módszerrel

A teljessejt lizátumokat konfluens és ritka A172 és T98G sejtvonalból készítettük. A konfluencia a 4.1 pontban leírtaknak megfelelően lett beállítva, a sejteket a 4.2 pontban leírtak szerint stimuláltuk. A stimulált és kontroll sejteket jéghideg pufferrel mostuk, majd lizáltuk. A lizátumok proteintartalmát Bradford módszere szerint megmértük, majd kiegyenlítettük. A fehérjetartalom kiegyenlítését követően a mintákat 10 percig 99°C-on forraltuk. A fehérjéket móltömegüknek megfelelő sűrűségű SDS-

PAGE géleken futtattuk és választottuk el. A futtatást követően a fehérjesávokat félszáraz blottolóval poli(vinilidén)-fluorid membránra vittük át. A membránt egy órán keresztül 5% tejport tartalmazó TBS pufferrel blokkoltuk, majd a vizsgált fehérjék ellen termeltetett monoklonális antitesttel jelöltük egy éjszakán át 4°C-on folyamatos billegő keverés mellett. Ezt követően a membránt fél órán keresztül többszöri oldateserével mostuk. Végül a membránokat az elsődleges antitestnek megfelelő peroxidáz konjugált másodlagos antitesttel jelöltük. A jelölést követően a membránt újból mostuk, majd a peroxidáz előhívó oldattal inkubáltuk. A Western-blot eredményét Protein Simple géldokumentációs rendszerrel tettük láthatóvá.

4.9. A sejt kultúrák proliferációjának vizsgálata

A konfluens és ritka sejt kultúrák proliferációját MTT alapú kolorimetriás esszével vizsgáltuk. Két nappal a mérés előtt a sejteket különböző kezdeti sejt koncentrációkban (9000 sejt/cm² és 150,000 sejt/cm² között) lapos felszínű 96 lyukú sejttenyésző plate-re passzáltuk. EZ4U reagenssel történő inkubációt követően a felülülő abszorbanciáját Synergy HT Multi-Detection microplate Reader készülékkel mértük 488nm-en, és a 620nm-es abszorbanciával korrigáltuk. Az így kapott abszorbancia értékeket a különböző kezdeti sejtsűrűségben passzált sejt kultúrák letapadása után közvetlenül meghatározott kalibrációs görbe segítségével konvertáltuk sejtszámokká.

A sejtosztódás valósidejű követésére impedancia alapú sejtadhéziós vizsgálatot (RTCA) végeztünk ECIS Z Θ készüléken. 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 impedanciagörbéket 4 kamra átlagából képeztük, és a kezdeti sejtszámokra normalizáltuk.

5. Eredmények és megbeszélés

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

5.1.1. A PDGFR β klaszteres eloszlást mutat és jelentős részben lipid-tutajokban lokalizálódik

A PDGF receptorokat indirekt immunfluoreszcenciával, PDGF receptor ellen termeltetett primer antitesttel és Cy3 konjugált másodlagos antitesttel jelöltük, és konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A lipid-tutajokat közvetlenül, koleratoxin B alegységhez kapcsolt Alexa Fluor 488 fluorofórral tettük láthatóvá. Megállapítottuk, hogy a receptort expresszáló A172 jelű és T98G jelű humán glioblasztóma sejtvonalakon a receptorok kolokalizálódtak a lipid tutajokkal.

A receptorok és lipid-tutajok kolokalizációjának kvantitatív értékelésére meghatároztuk a keresztkorrelációs koefficiens, amely arányosan nőtt a sejtkonfluencia növekedésével, azonban nem függött attól, hogy az adott mértékű konfluenciát a sejtek rövidebb, vagy hosszabb kultúrában eltöltött idő alatt érték el.

5.1.2. A PDGFR β lipid-tutaj- és konfluenciafüggő aktiválódása

Saját, és irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a PDGF receptorok konfluencia- és raft-függő szabályozása befolyásolhatja a receptor aktiváltsági állapotát.

Vizsgáltuk 2 perces, 20ng/ml koncentrációjú PDGF-BB-vel történő aktiválás hatását a specifikus tirozinokon foszforilált receptorok eloszlására konfluens és ritka sejtek membránjában. A PDGF receptor specifikus jelátviteli útvonalait elindító foszfortirozin reziduumait indirekt immunfluoreszcenciával jelöltük, membránbeli eloszlásukat a módszerekben bemutatott digitális képelemző algoritmussal kvantitáltuk.

Kezeletlen sejtkultúrák esetén az aktivált Tyr716 denzitása a sejtmembránban független volt a sejtek konfluenciájától. PDGF-BB-vel történő stimulálást követően az

aktivált Tyr716 denzitással arányos átlagos pixelintenzitás a ritka sejtek membránjában emelkedett meg, és a hatás kifejezettebb volt a lipid-tutajokon belül.

Az aktivált Tyr751-es denzitása nyugvó diszperz kultúrákban magasabb volt - elsősorban a lipid-tutajokon belül. PDGF-BB ligandummal történő aktiválást követően a konfluens sejtek membránjában ezen tirozin oldalláncainak foszforilációja nem nőtt számottevően, míg ritka sejtek raftjaiban a pTyr751 intenzitás növekedését láttuk.

A pTyr771-es eloszlására a konfluenciának nem volt hatása nyugvó kultúrák membránjában. PDGF-BB stimulust követően a konfluens sejtek membránjában mért átlagos pixelintenzitás megnőtt. A hatás a raftokon belül jóval kifejezettebb volt.

Nyugvó kultúrák esetén mind a rafton belül, mind azokon kívül a foszforilált Tyr1021 denzitást jellemző átlagos pixelintenzitás közel azonos volt a konfluens és ritka sejtek membránjában. PDGF-BB stimulációt követően az intenzitás a konfluens sejtek membránjában nőtt jelentősen, és ott is elsősorban a lipid-tutajokban.

5.1.3. A PDGFR β relatív specifikus foszforiláltsága függ a sejt-konfluenciától 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 sejt-felső felületének mintázatának, raft lokalizációjának és aktiváltsági állapotának változását ligandummal történő aktiválást követően. PDGF-BB stimulációt követően mind a tirozin foszforiláció, mind a receptorok raftbeli lokalizációja a sejt-konfluencia függvényében változott. Míg a ritka sejtek membránjának GM1 gazdag doménjeiben a Tyr716-os és Tyr751-es aminosavak oldalláncai foszforilálódtak, addig a konfluens sejtek raftjaiban a Tyr771-es és Tyr1021-es aktiválódása dominált.

Képelemző algoritmusunk segítségével meghatároztuk a sejt-felső felület relatív receptor foszforiláltságának lipid-tutajon belüli és azon kívüli megoszlását. Megállapítottuk, hogy stimulálatlan sejtek esetén a pTyr1021-es oldalláncai kivételével a specifikus relatív receptorfoszforiláltság magasabb a lipid-tutajokon kívül eső membránterületeken.

PDGF-BB ligandstimulációt követően a különböző jelátviteli útvonalakat szabályzó tirozinok aktivitásprofilja jelentősen eltért a ritka és konfluens sejtek raftjaiban. A Ras-MAPK proliferációs útvonalat stimuláló Tyr716-os aktiváltsága elsősorban a ritka sejtek, míg az ugyanezt gátló Tyr771-es a konfluens kultúrák lipid raftjaiban foszforilálódott.

A sejtek túlélését szabályzó PI3-kináz útvonal a Tyr751-es reziduumról, a sejtek migrációjában és a kétfázisú kalciumválasz megindításában szerepet játszó PLC γ útvonal a Tyr1021-esről indul el. Megállapítottuk, hogy a Tyr751-es reziduumok a diszperz sejtek raftjaiban aktiválódtak, míg a Tyr1021-es aminosavak foszforilációja a konfluens sejtek GM1 gazdag doménjeiben következett be.

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

Azt feltételeztük, hogy a receptor foszforiláltság raft-függő, illetve a receptorok sejtfelszíni lokalizációjának konfluenciafüggő szabályozása funkcionális következményekkel bírhat. A különböző jelátviteli útvonalakban részt vevő specifikus aktivátor és effektor proteinek szintjét különböző időtartamú PDGF-BB stimulálást követően ritka és konfluens kultúrákból preparált sejtizátumokban Western blot analízissel vizsgáltuk.

A Ras-MAPK útvonal nagy szerepet játszik a sejtproliferáció és a stresszre adott sejtválasz szabályozásában. Kísérleteinkben két MAP kináz aktiváltsági állapotát vizsgáltuk meg a PDGF-BB stimulálás időfüggésében. Az MKK3/MKK6 kinázok által aktivált p38 MAPK-t és a MEK1/2 által aktivált p42/p44 MAPK-t vizsgáltuk. A Western blot analízis alapján a MAPK útvonalat aktiváló Tyr716-os a ritka, míg az azt gátló Tyr771-es elsősorban a konfluens sejtekben foszforilálódott. PDGF-BB ligandummal történt aktiválást követően az aktivált p38 fehérje mennyisége nőtt a ritka sejtekben, míg a konfluens kultúrában az aktiváltság gyakorlatilag nem változott. A p42/44 fehérje PDGF-BB ligandummal történt aktiválást követően jobban foszforilálódott a ritka sejtekben, de a T98G sejt vonal esetén a konfluens kultúrában is

tapasztaltunk valamennyi foszforiláció növekedést a 15 és a 30 perces stimulust követően. Összességében elmondhatjuk, hogy a sejtek proliferációját szabályozó Ras-MAPK útvonal elsősorban a konfluens glioblasztóma kultúrákban aktiválódik a PDGFR ligandkötésekor.

A továbbiakban azt is 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 2h PDGF-BB stimulust követően konfluens és ritka A172 glioblasztóma kultúrákban.

Konfokális mikroszkópiás felvételeken megállapítottuk, hogy összhangban a ritka sejt kultúrában mért emelkedett MAPK aktivitással, a Ki-67 fehérje expressziós szintje jelentősen magasabb volt a ritka sejtek magjában. 2h PDGF-BB stimulust követően a látótér összes propidium-jodid festéssel megjelölt sejt magjának mintegy 85%-a mutatott erős Ki-67 pozitivitást a ritka sejtek esetén, míg konfluens kultúrákban ez az arány 1% alatt maradt.

A ritka sejt kultúrákban 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 150.000 sejt/cm² közötti tartományban változtattuk mindkét vizsgált sejt vonal esetén.

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 sejt vonal esetén csökkent is.

A konfluens és ritka sejt kultúrák proliferációs kinetikájának valós idejű összehasonlítását impedancia alapú sejtadhéziós vizsgálattal (RTCA) végeztük el a T98G sejt vonalon. Méréseink azt mutatták, hogy az inkubáció első tizenhét órájában a sejtek letapadnak, majd szétterülnek a rendelkezésükre álló felszínen. Az impedancia növekedése ebben a szakaszban a sejtosztódástól független volt. Ezután kezdődött az

aktív növekedés, ahol az impedancia változását a sejtproliferáció okozza. és azt láttuk, hogy a ritka kultúra esetén, a sejtek nagyobb ütemben szaporodnak, mint a konfluens kultúrában.

5.1.5. A PLC γ útvonal aktivitása és a következményes sejtmigráció konfluens kultúrákban dominál

Western blot analízissel megerősítettük, hogy a Tyr751-es a ritka, míg a Tyr1021-es elsősorban a konfluens sejtekben foszforilálódott stimulus hatására. Megfigyeltük, hogy a ritka és konfluens sejtekben a Tyr751 foszforiláció szintjén mért különbség nem érvényesül a jelátviteli útvonalban intermedier elhelyezkedésű Akt foszforilációjában.

A kétfázisú kalciumválasz kiváltásában szerepet játszó PLC γ útvonal a PDGF receptor aktivált Tyr1021-es oldalláncáról indul ki. Az irodalomban számos publikáció foglalkozik a különböző külső stimulusok hatására bekövetkező sejtmigráció kalciumfüggésével. Feltételeztük, hogy a megnövekedett intracelluláris kalciumszint befolyásolja az aktin citoskeleton átépülését, ezért a Tyr1021 reziduumhoz kapcsolódó vizsgálatokat egy, a sejtmigrációhoz szorosan kötődő intracelluláris fehérje, a RhoA vizsgálatával egészítettük ki.

Mindkét vizsgált glioblasztóma sejtvonal esetén megfigyeltük, hogy a pTyr1021 jel magasabb a konfluens sejtek esetén. A PLC γ / PKC útvonal fontos effektor hatása a RhoA fehérje foszforilációja, ami a Tyr1021 foszforilációjának megfelelően a konfluens sejtekben volt magasabb.

Konfokális mikroszkópiás eredményeink megerősítették, hogy 2h PDGF-BB stimulálást követően a konfluens sejtek mindkét kezeletlen kontroll, illetve a kezelt ritka sejt kultúrákhoz képest jóval magasabb pRhoA immunfluoreszenciás jelölődést mutattak.

Feltételeztük, hogy a PLC γ útvonal aktivációjának sejtkonfluencia függő szabályozása funkcionális jelentőséggel bír a sejtek migrációjának a szintjén, ezért megvizsgáltuk a cortactin, egy RhoA által regulált fehérje akkumulációját a migrációt

irányító fokális adhéziós plakkokban. Megállapítottuk, hogy míg stimulálatlan diszperz sejt kultúra esetén a cortactin a sejtmembrán alatti klaszterekben gyűlik össze, addig konfluens sejtekben citoplazmatikus lokalizációt mutat. 2h PDGF-BB ligandstimulációt követően a ritka sejtekben a cortactin mennyisége csökken, lokalizációja perinukleárisává válik, míg konfluens sejtekben mennyisége megnő, és a polarizált sejt vezető szélén kialakuló kitüremkedésekben, a lamellopodiumokban akumulálódik.

5.2. Platina alapú kemoterápiás szerek és a TRAIL raft-függő szinergizmusa a DR4 és DR5 mediált, kaszpáz-8 dependens apoptózis indukciójában

5.2.1. 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. Megfigyelésünk alapján feltételeztük, hogy az LA-12 és a ciszplatin által indukált extrinsic apoptotikus útvonal szabályozásában a plazmamembránnak fontos szerepe lehet.

5.2.2. 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. A kontrollhoz képest jelzett változás mértéke 20-200%-os volt. Kiugró expressziós szint emelkedést okozott a cDDP kezelés a HCT-116-os

sejtvonal DR5 TRAIL receptora esetén, valamint az LA-12 kezelés a PC-3 sejtvonal DR4 TRAIL receptoránál.

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

Mind ciszplatinnal, mind LA-12-vel történt az 1 órás kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a TRAIL receptorok raft lokalizációja a HCT-116 és a PC-3 sejtvonalakon fokozódott. Mindkét sejtvonal 1-es típusú TRAIL receptorán a 0,5 μ M LA-12 kezelés, illetve a TRAIL receptor 2-es típusán mindkét kezelés szignifikánsan hatásosnak bizonyult ($p < 0,05$).

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

Vizsgáltuk TRAIL ligandummal történő 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.

Egy órás kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a TRAIL receptorok raft lokalizációja a HCT-116 és a PC-3 sejtvonalakon az alap szint alá csökkent.

5.2.5. Az LA-12 és a ciszplatin által közvetített TRAIL-indukált citotoxicitás az apoptotikus kaspáz kaskád aktiválásán keresztül valósul meg

A annak érdekében, hogy feltárhassuk a platina származékok által kiváltott citotoxicitás molekuláris alapját, Western blot analízissel vizsgáltuk a kaspáz kaskád kialakításában részt vevő kaspáz-8 és kaspáz-3 mennyiségének és degradációjának változását a különböző kombinációban alkalmazott kezeléseket követően. Megállapítottuk, hogy HCT-116 sejtvonal esetén ciszplatin, vagy LA-12 előkezelést

követően alkalmazott TRAIL aktiválta a kaspáz kaskádot. TRAIL liganddal, vagy platina komplexszel önállóan kezelt HCT-116 sejtekben ilyen hatást nem tapasztaltunk.

A pro-kaspáz-8 és -3 fehérjék hasításának hasonló mértékű növekedése megfigyelhető volt a PC-3 sejtvonalon esetén is, azonban itt TRAIL ligandstimulálás kisebb mértékben önmagában is hatásosnak bizonyult.

6. Következtetések

6.1. 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 proliferációjában és 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 reziduumaikról kiinduló jelátviteli útvonalak aktiváltsága függ a receptorok raftokhoz való asszociációjától valamint a sejt kultúra konfluenciájától. PDGF-BB stimulációt követően a Ras-MAPK útvonalra specifikus Tyr716-os, illetve a PI3-kináz / Akt útvonalra specifikus Tyr751-es 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 pozitívítást, és proliferációs rátát mutattak. Ugyanakkor a foszfolipáz-C γ / PKC útvonalra specifikus Tyr1021-es aktiváltsági állapota a konfluens kultúrákban volt magasabb, ugyanitt a RhoA foszforiláció és a cortactin vezető széleken történő feldúsulása is sokkal jelentősebb volt. A PDGF stimulus által kiváltott tirozin foszforiláció az reziduumtól függetlenül dominánsan a GM1 pozitív lipid doméneken következett be.

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy ugyanazon stimulus képes lipid raft-függő módon eltérő, a sejt kultúra konfluenciájának megfelelő, releváns jelátviteli útvonalakat aktiválni. Esetünkben ezek az útvonalak a sejtosztódást serkentik a ritka kultúrákban, viszont gátolják azt a konfluens sejtenyészetekben, és ugyanitt a migrációt serkentik.

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

A TNF családba tartozó TRAIL ligand — más rákellenes szerekkel együttműködve — számos tumorsejtféleség esetén tömeges sejthalált idéz elő, ill. módosítja azok kemoterapeutikumokkal szemben mutatott rezisztenciáját. A ligand két receptorán keresztül (DR4 és DR5) képes a sejtek apoptózisához vezető jelátviteli útvonalakat beindítani. Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét platina komplex képes fokozni a TRAIL receptorok expresszióját a vizsgált sejtvonalakon. A colon carcinoma sejteken legjobban a ciszplatin kezelés fokozta a DR5 receptor sejtfelszíni expresszióját, míg a prosztatarák sejtek esetén az LA-12 platinakomplex a DR4 kifejeződését. Mindkét platina komplex mindkét sejtvonal esetén fokozta a lipid raftok és a TRAIL receptorok közötti kolokalizációt, de az LA-12 huszadannyi koncentrációban is hatékonyabb volt, mint a ciszplatin. A TRAIL kezelés - függetlenül a ciszplatin előkezeléstől - időfüggő módon befolyásolta a TRAIL receptorok membránszintjét és azok raft-lokalizációját. 5-20 percig alatt fokozta a receptorok expressziós szintjét és azok kolokalizációját a lipid doménekkal, míg egy után a kolokalizáció az alapszint alá csökkent, feltehetően internalizáció miatt. A platina komplex és a TRAIL együttes hatására a kezelt tumorsejtek fokozott apoptózisa következett be, amely feltehetően a ciszplatin és a TRAIL DR4 és DR5 receptorokat raftba lokalizáló, valamint a TRAIL kezelés receptor internalizációt fokozó hatásának együttes következménye. Ez a megfigyelés felveti a sikeres klinikai alkalmazás lehetőségét.

7. 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 sejt-kultúra konfluenciájától függően eltérő és adekvát irányokban képes befolyásolni a jelentős jelátviteli kimeneteket. A sejtostódást fokozó jelpályák a ritka sejt-kultúrákban 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 sejt felszíni 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.



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

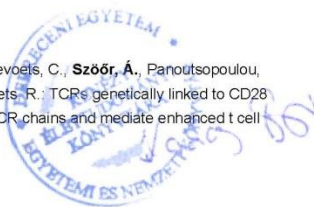
Jelölt: Szóór Árpád
Neptun kód: ALEKKW
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034414

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szóór, 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)
2. Vondalova, B.O., Jelínková, I., **Szóór, 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

3. Govers, C., Sebestyén, Z., Roszik, J., van Brakel, M., Berrevoets, C., **Szóór, Á.**, Panoutsopoulou, K., Broertjes, M., Van, T., Vereb, G., Szöllősi, J., Debets, R.: TCRs genetically linked to CD28 and CD3[epsilon] 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





4. Nagy, D., Gönczi, M., Dienes, B., **Szőőr, 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
5. Pázmándi, K., Kumar, B.V., Szabó, K., Boldogh, I., **Szőőr, 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
6. Roszik, J., Sebestyén, Z., Govers, C., Guri, Y., **Szőőr, Á.**, Pályi-Krek, 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. **Szőőr, 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 alapján a közleményekre):
10,017

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

Debrecen, 2015.12.08.

