

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Csomós István

**STAT jelátviteli útvonalak vizsgálata humán tumor eredetű
sejtvonalakon egyedi sejt szintű módszerekkel**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**STAT jelátviteli útvonalak vizsgálata humán tumor eredetű
sejtvonalakon egyedi sejt szintű módszerekkel**

Csomós István

Témavezető: Dr. Dóczy-Bodnár Andrea



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A STAT fehérjék	8
2.1.1. A STAT3 transzkripció faktor felépítése	10
2.1.2. Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli út vonal	12
2.1.3. STAT3 szerepe az onkogenezisben	25
2.2. Kelidonin	27
2.2.1. Alkaloidok	27
2.2.2. Vérehulló fecskefű (<i>Chelidonium majus</i>)	28
2.2.3. Benzofenantridin-váz as alkaloidok	29
2.2.4. Kelidonin molekuláris szerkezete és ismert hatásai	30
2.3. Mikrotubulus-célzó szerek	31
3. Célkitűzések	36
4. Anyagok és módszerek	37
4.1. Felhasznált oldatok	37
4.2. OCM sejt vonalak jellemzése	37
4.3. Sejttenyésztés és kezelés	38
4.3.1. Kelidonin kezelés	38
4.3.2. IL-6 kezelés	39
4.4. Áramlási citometria	39
4.5. Konfokális mikroszkópiás vizsgálatok	40
4.6. Sejthalál vizsgálatok	41
4.6.1. DNS fragmentáció vizsgálata	41
4.6.2. Apoptózis vizsgálat Annexin V és propídium jodid kombinált alkalmazásával	42
4.7. Sejtciklus vizsgálatok	44
4.8. Fehérje expresszió és STAT3 foszforiláció vizsgálata	45
4.8.1. Membránfehérjék immunfluoreszcens jelölése	45
4.8.2. Intracelluláris sejtalkotók immunfluoreszcens jelölése	45
4.8.3. Áramlási citometriás fehérje expresszió és STAT3 foszforilációs vizsgálatok kiértékelése	46
4.8.4. Mikrotubulusok jelölése	47
4.8.5. STAT3 magi transzlokáció kvantitatív analízise	48
4.9. Statisztikai elemzések	50
5. Eredmények	51
5.1. Kontroll vizsgálatok	51
5.1.1. IL-6 stimulált STAT3 aktiváció optimalizálása	51
5.1.2. DMSO hatása a STAT3 tirozin foszforilációjára	53
5.2. A kelidonin apoptózist és nekrozist indukál humán uveális melanóma sejteken	54
5.3. A kelidonin berekeszti a sejtciklust a G ₂ /M fázisban és károsítja a mikrotubulusokat	56

5.4.	A kelidonin gátolja az IL-6-indukált STAT3 aktivációt _____	58
5.5.	Kelidonin hatására csökken a gp130 alegység expressziója _____	62
5.6.	Kelidonin hatására megemelkedik a konstitutív pSer-STAT3 szint _____	66
5.7.	A csökkent STAT3 aktiváció és a megemelkedett pSer-STAT3 szint korrelált vizsgálata _	68
5.8.	A kelidonin időfüggő módon befolyásolja a STAT3 foszforilációt OCM-1 sejteken _____	71
5.9.	Kelidonin hatására fokozódik a Bcl-2 expressziója _____	73
6.	Megbeszélés _____	77
7.	Összefoglalás _____	84
8.	Summary _____	85
9.	Irodalomjegyzék _____	86
9.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke _____	86
9.2.	Saját közlemények jegyzéke _____	94
10.	Tárgyszavak/Keywords _____	97
11.	Nyilatkozat saját munkáról _____	98
12.	Köszönetnyilvánítás _____	99
13.	Függelék _____	100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APC	anafázis promóveáló komplex	anaphase promoting complex
Bak	Bcl -2 homológ antagonista/gyilkos	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-asszociált X fehérje	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-sejtes limfóma 2 fehérje	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-XL	extra nagy B-sejtes limfóma fehérje	B-cell lymphoma-extra large protein
Bim	Bcl-2 kölcsönható sejthalál mediátor	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 módosító faktor	Bcl-2 modifying factor
BSA	borjú szérum albumin	bovine serum albumin
CB modul	citokin-kötő modul	cytokine-binding module
Cdc	sejtosztódási ciklus homológ fehérje	cell division cycle homolog protein
Cdk	ciklin-dependens kináz	cyclin-dependent kinases
CE	kelidonin	chelidone
CIS	citokin-indukált SH2-tartalmú fehérje	cytokine-inducible SH2-containing protein
CLC	cardiotropinszerű citokin	cardiotrophin-like cytokine
CLL	krónikus limfoid leukémia	chronic lymphocytic leukaemia
CNTF	ciliáris neurotróf faktor	ciliary neurotrophic factor
CREB	ciklikus adenosin monofoszfát válaszelem kötő fehérje	cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
CT-1	kardiotropin-1	cardiotrophin 1
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	4',6-diamidino-2-phenylindole
DKD	DNS-kötő domén	DNA-binding domain
DMSO	dimetil-szulfoxid	dimethyl sulfoxide
EGF	epidermális növekedési faktor	epidermal growth factor
EMT	epitéliális-mezenchimális átmenet	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz	extracellular signal-regulated kinase
FAS	FS-7 asszociált sejtfelszíni antigén	FS-7-associated surface antigen
FBS	fötális borjú szérum	fetal bovine serum
FGF	fibroblaszt növekedési faktor	fibroblast growth factor
FITC	fluorescein-izotiocianát	fluorescein isothiocyanate
FN-III domén	III. típusú fibronektinszerű domén	fibronectin type III domain
Fsc	előre irányuló fényszórás	forward light scatter
GAS	interferon- γ aktivált szekvencia	interferon- γ activated sequence
gp130	glikoprotein 130	glycoprotein 130

GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor	G protein-coupled receptor
HIF	hipoxia indukálható 1 faktor	hypoxia-inducible factor
Hsp70	hősokk fehérje 70	heat shock protein 70
Ig	immunoglobulin	immunoglobulin
IL-6	interleukin-6	interleukin-6
IL-6R	interleukin-6 receptor	interleukin-6 receptor
IFN	interferon	interferon
I κ B α	NF- κ B inhibitor α	NF- κ B inhibitor α
Jak	Janus kináz	Janus kinase
LIF	leukémia gátló faktor	leukemia inhibitory factor
LR	linker régió	linker region
MAPK	mitogén aktivált protein kináz	mitogen-activated protein kinase
Mad2	mitotikus orsó ellenőrzési pont fehérje 2	mitotic spindle assembly checkpoint protein 2
MEK	mitogén aktivált protein kináz kináz	mitogen-activated protein kinase kinase
Mcl-1	mieloid sejtes leukémia 1	myeloid cell leukemia-1
mitoSTAT3	mitokondriális STAT3	mitochondrial STAT3
MMP	mátrix metalloproteináz	matrix metalloproteinase
MRP	multidrog rezisztencia fehérje	multidrug resistance protein
MTA	mikrotubulus-célzó ágens	microtubule-targeting agent
mTOR	emlős rapamicin célpont kináz	mammalian target of rapamycin
NcoA	magreceptor koaktivátor	nuclear receptor coactivator
NF- κ B	nukleáris faktor-kappa B	nuclear factor kappa B
Noxa	forbol-12-mirisztát-13-acetát indukált fehérje 1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NP	neuropoetin	neuropoietin
NTD	N-terminális domén	N-terminal domain
OCM	okuláris choroidális melanóma	ocular choroidal melanoma
OSM	onkosztatin M	oncostatin M
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat	phosphate buffered saline
PDGF	vérlemezké eredetű növekedési faktor	platelet-derived growth factor
PE	fikoeritrin	phycoerithrin
PgP	P-glikoprotein	P-glycoprotein
PI	propídiium jodid	propidium iodide
PIAS	aktivált STAT fehérje inhibítora	protein inhibitor of activated STAT
PKC	protein kináz C	protein kinase C

pSer-STAT3	szerin foszforilált STAT3	serine-phosphorylated STAT3
PTEFb	pozitív transzkripció elongáló faktor	positive transcription elongation factor
PTK	protein tirozin kinázok	protein tyrosine kinases
PTP	protein tirozin foszfátázok	protein tyrosine phosphatases
pTyr-STAT3	tirozin foszforilált STAT3	tyrosine-phosphorylated STAT3
PUMA	p53-szabályozott apoptózis modulátor	p53 upregulated modulator of apoptosis
RTK	receptor tirozin kináz	receptor tyrosine kinase
ROS	reaktív oxigénszármazék	reactive oxygen species
SAC	orsó összeszerelési ellenőrző pont	spindle assembly checkpoint
SH2 domén	src-homológ 2 domén	Src homology 2 domain
sIL-6R α	szolubilis IL-6R α	soluble IL-6R α
SOCS	citokin jelátvitelt elnyomó fehérje	suppressor of cytokine-signaling proteins
SHP2	SH2-domén tartalmú fehérje tirozin foszfátáz-2	SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2
Ssc	oldalirányú fényszórás	side scatter
STAT	jelátviteli és transzkripció aktivátor	signal transducer and activator of transcription
SUMO	ubikvitinszerű modulátor fehérje	ubiquitin-like modulator protein
TAD	transzaktivációs domén	transactivation domain
TC45	T-sejt fehérje tirozin foszfátáz (45 kDa)	T-cell protein tyrosine phosphatase (45 kDa)
T _H	segítő T-sejt	helper T cell
TNF	tumor nekrosis faktor	tumor necrosis factor
TPA	12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát	12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate
T _{reg}	szabályozó T-sejt	regulatory T cell
Tyk2	tirozin kináz 2	tyrosine kinase 2
UM	uveális melanóma	uveal melanoma
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor	vascular endothelial growth factor

1. BEVEZETÉS

A gyógynövényekből származó természetes alkaloidok, illetve félszintetikus származékaik számos farmakológiai hatással bírnak, melyek megalapozzák klinikai alkalmazhatóságukat, többek között daganatellenes terápiák hatóanyagaként. Ez utóbbi szempontból kiemelt jelentőségű celluláris célpontjaik közé tartoznak a citoszkeletális rendszer elemei, valamint a sejtosztódást, sejttúlélést és migrációt szabályozó jelátviteli folyamatok, melyek egyik prominens példája az IL-6/IL-6R/STAT3 útvonal.

A késői/látens citoplazmatikus transzkripciós faktorok csoportjába tartozó jelátvivő és génátíródást aktiváló fehérje 3 (STAT3) számos olyan sejtfolyamatban tölt be szabályozó szerepet, amelyek hibás vagy elégtelen szabályozása a sejtek tumoros transzformációját okozhatja. A STAT3 egyik célgénje a B-sejtes limfóma 2 fehérjét (Bcl-2) kódoló gén. A Bcl-2 az azonos nevű fehérjecsalád egyik antiapoptotikus tagja, amely az apoptózis mitokondriális útvonalának gátlásán keresztül segíti elő a sejtek túlélését.

A STAT3 aktivációjához és kanonikus funkcióinak betöltéséhez a 705-ös pozícióban elhelyezkedő tirozin foszforilációja szükséges, melyet a transzkripciós faktor dimerizációja és magi transzlokációja követ. A STAT3 a 727-es pozícióban található szerin aminosav oldalláncon is foszforilálódhat: a szerin foszforiláció egyrészt szabályozza a STAT3 transzkripciós aktivitását, ugyanakkor a STAT3 egyéb, nem kanonikus funkcióiban is kritikus szerepet tölthet be. A STAT3 egyik fontos aktivátora az interleukin-6 (IL-6) citokin, amelynek emelkedett koncentrációját több tumorféleség, így az uveális melanóma (UM) mikrokörnyezetében is kimutatták.

A kemoterápiás szerek egyik fontos csoportját a mikrotubuláris rendszert célzó ágensek (MTA) alkotják. Közös jellemzőjük a mitózis gátlása, ugyanakkor más, akár a sejtosztódástól független folyamatokba, így a STAT3 fehérje funkciójába is beavatkozhatnak. A benzofenantridin-vázis alkaloidok közé tartozó kelidonin biológiai hatásai átfednek az MTA-k fent említett hatásaival (mikrotubulus polimerizáció, G₂/M blokk), így felmerül a kérdés, hogy vajon a STAT3 transzkripciós faktor működését szintén befolyásolja-e.

Az értekezésben bemutatott munkám során a kelidonin IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonalra (*I. cikk*), valamint a Bcl-2 antiapoptotikus fehérje expressziójára gyakorolt hatását tanulmányoztam humán uveális melanóma sejteken, elsősorban áramlási citometriás és konfokális mikroszkópiás módszerekkel. Eredményeink egyrészt hozzájárulhatnak egy potenciális tumorelles ágens, a kelidonin, hatásmechanizmusának feltérképezéséhez. Másrészt az egyedi sejtszintű információt szolgáltató módszerek alkalmazása elősegíti a

STAT3 kétféle foszforilációs állapota közötti összefüggés megértését, így munkám általánosságban is hozzájárulhat a STAT3-specifikus terápiák megtervezéséhez. Az értekezésemhez felhasznált másik közlemény (*II. cikk*) az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátvitel intracelluláris elemeinek, valamint a Bcl-2 fehérje expressziójának vizsgálatát módszertanilag alapozta meg.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A STAT fehérjék

Az 1994-ben felfedezett, a citoplazmatikus transzkripciós faktorok családjába tartozó STAT fehérjék sejtfelszíni receptorok ligandum kötése által kiváltott jeleket továbbítanak a sejtmagba. Emlősökben eddig hét, különböző gének által kódolt STAT fehérjét írtak le, ezek a STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b és STAT6. Felépítésükben 750-900 aminosav vesz részt. Az egyes STAT transzkripciós faktorok jellemzőit az I. táblázatban foglaltam össze.

I. táblázat: A STAT transzkripciós faktorok jellemzői

Név	Méret (kDa)	Kromoszómális elhelyezkedés	Foszforilációs helyek		Legfontosabb aktivátorok
STAT1	91	2q32.2	Tyr701	Ser727	IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , IL-9
STAT2	113	12q13.3	Tyr690	-	IFN- α , IFN- β , IFN- λ
STAT3	92	17q21.2	Tyr705	Ser727	citokinek: IL-6, IL-2, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-15, IL-22 növekedési faktorok: EGF, PDGF, FGF
STAT4	89	2q32.2	Tyr693	Ser721	IL-12
STAT5A	94	17q21.2	Tyr694	Ser727 Ser780	citokinek: IL-2, IL-5, IL-7, IL-15 hormonok: eritropoetin, prolaktin, növekedési hormon
STAT5B	92	17q21.2	Tyr699	Ser731	
STAT6	110	12q13.3	Tyr641	-	IL-4, IL-13

IFN: interferon; **IL:** interleukin; **EGF:** epidermális növekedési faktor; **PDGF:** vérlemezke eredetű növekedési faktor; **FGF:** fibroblaszt növekedési faktor) (Awasthi et al., 2021; Verhoeven et al., 2020)

A STAT fehérjék által aktivált gének kritikus szerepet töltenek be a sejtek proliferációjának, túlélésének és differenciálódásának, valamint funkcionális aktivitásának szabályozásában, melynek révén közreműködésük számos fiziológias folyamatban alapvető jelentőségű (pl. embrionális fejlődés, őssejt homeosztázis, hematopoézis, immunrendszer szabályozása, angiogenezis, stb.) (Sehgal, 2000; Verhoeven et al., 2020). A szabályozott

celluláris folyamatok jellegéből adódóan a rendellenes STAT jelátvitel a sejtek malignus transzformációját eredményezheti, így kritikus faktor az onkogenezis folyamatában.

Felfedezésükkor a STAT transzkripciós faktorokat a génátíródás indukálható aktivátoraiként azonosították. A STAT jelátvitel kanonikus mechanizmusának alapja a STAT fehérjék tirozin foszforiláció általi aktivációja, amely tipikusan a Janus kináz (Jak) családba tartozó citoszolikus, nem-receptor típusú protein tirozin kinázok közreműködésével történik (Jak/STAT útvonal). A tirozin kináz aktivitással rendelkező növekedési faktor receptorok akár közvetlenül, a Jak fehérjék bevonása nélkül is foszforilálhatják a STAT molekulákat. A STAT transzkripciós faktorok aktiválódását elsősorban citokinek, így interferonok és interleukinek, valamint egyes, membránreceptorokhoz kötődő növekedési faktorok és hormonok válthatják ki (I. táblázat). Az aktiváló ligandumok száma és típusa alapján a STAT fehérjéket két csoportra oszthatjuk. Míg a STAT2, STAT4 és STAT6 esetén csupán néhány (egy vagy két) citokin válthatja ki a transzkripciós faktorok aktivációját, a család többi tagja az extracelluláris jelek jóval szélesebb spektrumára válaszol (Awasthi et al., 2021; Lim & Cao, 2006; Stark et al., 2018; Verhoeven et al., 2020).

Nagymértékű szerkezeti homológiájuk következtében a STAT fehérjék aktiválódása azonos elvek mentén történik, amelyeket röviden ismertetek a jelen fejezetben. Részletesebben az 2.1.2.4. fejezetben, a dolgozatom tárgyát képező IL-6/IL-6R/STAT3 jelátvitel példáján mutatom be az aktiváció lépéseit és szabályozását. Stimuláció hiányában a STAT fehérjék nagyrészt a citoplazmában helyezkednek el inaktív, foszforilálatlan formában, elsősorban monomerek, esetenként dimerek formájában (Awasthi et al., 2021; Lim & Cao, 2006). A jelmolekula receptorhoz történő kötődése a STAT fehérjék C-terminális végéhez közel található tirozin oldallánc foszforilációjához vezet (I. táblázat, 1. ábra). A tirozin foszforiláció a transzkripciós faktor (homo- és/vagy hetero) dimerizációját, és magi transzlokációját, majd végül a célgénnek átíródásának fokozódását/aktivációját eredményezi.

A STAT aktiváció fiziológias körülmények között tranziens és szigorúan szabályozott, amelyben alapvetően három, különböző szinten ható negatív szabályozó mechanizmus közreműködését szükséges megemlíteni: (1) a transzkripciós faktor defoszforilációját végrehajtó fehérje tirozin foszfatázok; (2) az aktív receptor komplexhez kötődő, s így a további jelátvitelt megakadályozó fehérjék; (3) illetve a STAT-DNS kölcsönhatást gátló magi regulátorok (Levy & Darnell, 2002).

A STAT aktivációt szabályozó pozitív és negatív mechanizmusok egyensúlyának felborulása kóros folyamatokhoz, így malignus elváltozások kialakulásához vezethet (Lee & Cheung, 2019). A STAT fehérjék konstitutív aktivációját megfigyelték humán hematológiai

(leukémiák, limfómák és mielóma multiplex) és szolid daganatokban (pl. fej-, nyak-, mell-, melanóma és prosztata daganat) (Buettner et al., 2002; Ebersbach et al., 2021). A daganatos megbetegedések kialakulásában a STAT1, STAT3 és STAT5 fehérjék szerepe kulcsfontosságú, a STAT2, STAT4 és STAT6 korlátozottabb szerepet töltenek be. A daganatos sejtek többféle stratégiát alakítanak a gazdaszervezet daganatellenes válaszáinak elkerülésére. Ahhoz, hogy túléljenek, terjeszkedjenek és áttéteket képezzenek, kritikus a daganatok növekedése és alkalmazkodniuk kell a megújult mikrokörnyezetükhöz. Ezekben a stratégiákban a STAT fehérjék jelentős szabályozó szerepet játszanak (Verhoeven et al., 2020).

Fontos megjegyezni, hogy az előzőekben felvázolt, klasszikus jelátviteli mechanizmus mellett a STAT fehérjék alternatív, ún. nem-kanonikus mechanizmusok révén is kifejthetik hatásukat, akár foszforilálatlan formában is. Így pl. a célgének átíródásának fokozása helyett okozhatják a transzkripció represszióját, de emellett sejtmagon kívüli folyamatokban is szerepet játszhatnak (Awasthi et al., 2021).

A STAT2 és a STAT6 kivételével a STAT transzkripciós faktorok szerin foszforilációs helyet is tartalmaznak (I. táblázat, 1. ábra), amelynek egyrészt szerepe lehet a transzkripciós aktivitás kontrollálásában, de a fent említett nem-kanonikus funkciókban betöltött szerepére is találhatunk adatokat (Decker & Kovarik, 2000; Wang & Sun, 2014).

2.1.1. A STAT3 transzkripciós faktor felépítése

A STAT3 transzkripciós faktor egy 92 kDa méretű polipeptidláncból áll, amelyet 770 aminosav alkot. A fehérjét a 17-es kromoszómán található *stat3* gén kódolja. A fehérje vázlatos felépítését, beleértve az előző fejezetben említett hat, a STAT fehérjékre jellemző konzervatív funkcionális domén megnevezését és elhelyezkedését, az 1. ábra mutatja (Awasthi et al., 2021; Wang & Sun, 2014).

Az N-terminális végtől kezdve a STAT3 (és a többi STAT fehérje) a következő doméneket tartalmazza:

(1) N-terminális domén (NTD): több α -hélixből felépülő, kampószerű struktúra, amely az egyes STAT fehérjék közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában vesz részt. Ezáltal egyrészt lehetővé teszi a nem-foszforilált STAT fehérjék dimerizációját, másrészt kritikus az ún. dimer-dimer, azaz tetramer szerkezet kialakulásában is. Ez utóbbi elengedhetetlen a STAT3 fehérje stabil kötődéséhez a célgének promóter régiójához.

(2) Coiled-coil domén: szintén fehérje-fehérje kölcsönhatási hely. Több α -hélixből felépülő, kötészerű struktúra, amely transzkripciós faktorok és szabályozó fehérjék (koaktivátorok és korepresszorok) kapcsolódását biztosítja. Ugyancsak ebben a régióban található az a nukleáris

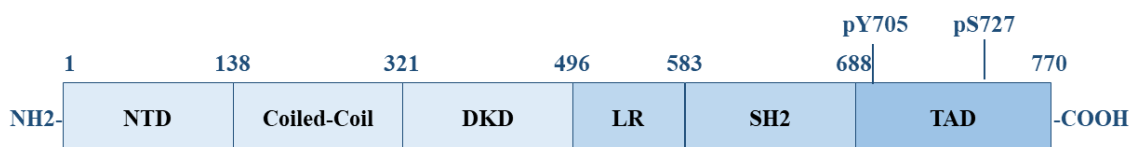
lokalizációs szignál, amely a magi transzportot biztosítja az importin molekulákkal való kölcsönhatás révén.

(3) DNS-kötő domén (DKD): immunglobulinszerű struktúra, amely a specifikus DNS target szekvencia felismerését és a STAT fehérjének ehhez a szekvenciához való kötődését teszi lehetővé. A STAT3 esetén ez az ún. interferon gamma (IFN γ)-aktivált szekvenciát (GAS) jelent, ami a targetgének promóter régiójában található meg.

(4) Linker régió (LR): az α -helikális szerkezetű linker régió a megfelelő fehérje konformáció kialakításában vesz részt, amely kritikus mind az aktiváció, mind a következményes DNS kötés folyamatában. Emellett egyfajta kontaktpontként szolgál a transzkripció komplex kialakulásában is.

(5) Src-homológia domén (SH2): jelentős mértékben konzervált régió, amely nemcsak a STAT molekulákon, hanem számos egyéb, a jelátviteli folyamatokban érintett fehérjén megtalálható. Specifikus foszfortirozin motívumok felismerése és ahhoz történő kapcsolódása révén segíti elő fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását, jelen esetben az inaktív STAT fehérjének a tirozin foszforilált receptor láncokhoz való kapcsolódását, valamint az aktivált (tirozin foszforilált) STAT monomerek dimerizációját.

(6) Transzaktivációs domén (TAD): a C-terminális végen található domén egyrészt a transzkripció regulátorokkal való kommunikációban vesz részt, másrészt itt helyezkedik el az a tirozin aminosav, amelynek foszforilációja a STAT transzkripció faktorok aktivációjának alapja. Ennek a tirozinnek a foszforilációja hozza létre azt a foszfortirozin motívumot, amely az előző pontban említett SH2 doménnel kölcsönhatva teszi lehetővé az aktivált transzkripció faktor dimerizációját. A STAT3 esetén ez a tirozin a 705-ös pozíciót foglalja el. Ugyancsak a TAD-en helyezkedik el az a szerin aminosav, amely a második foszforilációs helyet biztosítja. A STAT3 esetén ez a szerin aminosav a 727-es pozícióban található (Buettner et al., 2002; Decker & Kovarik, 2000).



1. ábra: A STAT3 transzkripció faktor doménszerkezete

A STAT3 fehérje hat jól elkülöníthető doménből épül fel, ideértve az N-terminális domént (NTD), a coiled-coil domént, a DNS-kötő domént (DKD), a linker régiót (LR), az SH2 domént (SH2), valamint a transzaktivációs domént (TAD). Ez utóbbin helyezkedik el a tirozin és szerin foszforilációs hely (Wang & Sun, 2014).

A STAT3-nak négy fő izoformája létezik, amelyek alternatív splicing, illetve proteolitikus hasítás révén alakulnak ki. A STAT3 elnevezéssel rendszerint a STAT3 α (92 kDa) izoformára utalunk. A STAT3 β (83 kDa) izoformából hiányzik a TAD régió, ezáltal a szerin foszforilációs helyet sem tartalmazza, helyette egy unikális 7-aminosavból álló szekvencia található a C-terminális végen. A STAT3 α és STAT3 β izoformák alternatív splicing révén alakulnak ki, amelyet az utóbbiban 7 új aminosavat kódoló nukleotidszekvencia, illetve egy stop kodon beillesztése követ. A másik két izoforma poszttranszlációs proteolitikus hasítás révén alakul ki: a STAT3 γ (72 kDa) az α , míg a STAT3 δ (64 kDa) a β izoforma hasításának eredménye. A tirozin és szerin foszforilációs helyek mind a γ , mind pedig a δ izoformából hiányoznak (Aigner et al., 2019).

A foszforiláció mellett más poszttranszlációs módosítások is részt vesznek a STAT3 aktivitásának szabályozásában: acetiláció (Lys9, 87, 601, 615, 631, **685**, 707 vagy 709) és metiláció (Lys49, 140 vagy **180**), glutationizáció (Cys328 és 452); ubikvitináció és SUMO-izáció (ubikvitinszerű modulátor fehérje kapcsolása) (Lys451) (Tesoriere et al., 2021; Tomic & Frank, 2021). Ezek a módosítások a transzkripció faktor dimerizációjának, magi transzlokációjának, koaktivátorokkal történő komplexképződésének, valamint degradációjának modulálása révén járulnak hozzá a transzkripció kimenet finomhangolásához (Guanizo et al., 2018; Huynh et al., 2019).

2.1.2. Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli út vonal

A STAT3 transzkripció faktor szerepét elsőként az IL-6 jelátvitelében azonosították. Később kimutatták, hogy aktiválódását más citokinek, valamint egyes növekedési faktorok és hormonok is kiválthatják (I. táblázat) (Xiong et al., 2014). Az IL-6 és az IL-6 citokin család többi tagja mellett pl. a γ_c (közös γ receptor alegységet használó) citokinek többségének jelátvitelében is szerepel, általában a STAT1 és STAT5 párhuzamos aktiválódásával együtt. Az értekezésemben bemutatott vizsgálatok az IL-6 által kiváltott STAT3 aktivációra vonatkoztak, így a továbbiakban ennek ismertetésére szorítkozom.

2.1.2.1. Az IL-6 citokincsalád

A citokinek kis molekulatömegű polipeptidek, melyek szerkezetét gyakran N- és/vagy O-glikolizációk, valamint intramolekuláris diszulfidhidak stabilizálják. Fontos szerepet játszanak a többsejtű élőlények sejtjei közötti kommunikációban. Extracelluláris szolubilis mediátorként, nano- és pikomoláris koncentrációban számos fiziológias és patológias folyamat szabályozásában játszanak szerepet (Heinrich et al., 1998).

A citokinek működésére a pleiotropizmus jellemző, tehát egyidejűleg több különböző célsejtre hathatnak. Hatásukat additív, szinergikus vagy antagonista módon befolyásolhatják más citokinek. Pleiotróp hatásaik mellett a citokinek hatása gyakran redundáns, azaz egy adott biológiai folyamat vagy sejtválasz szabályozásában több különböző citokin is hasonló szerepet tölthet be. A célsejtekre gyakorolt hatásukat auto-, para vagy esetenként endokrin jelátvitelen keresztül fejtik ki (Heinrich et al., 1998).

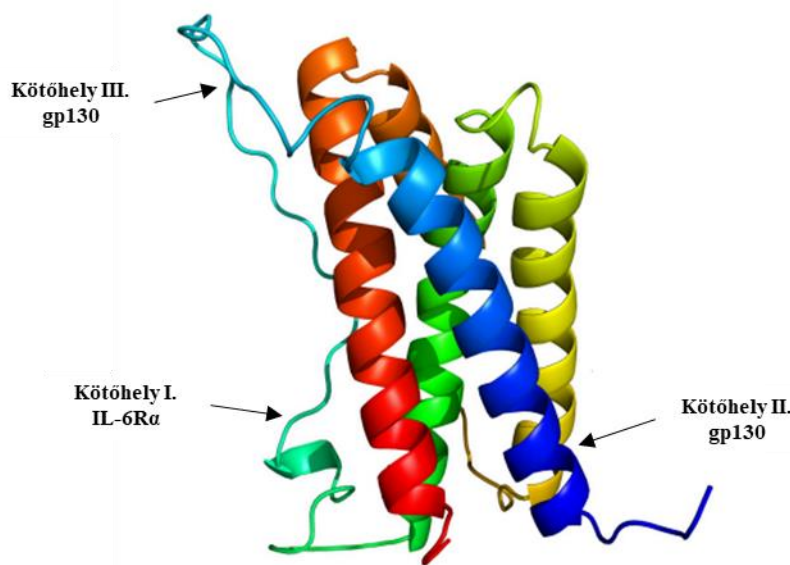
A citokinekre jellemző redundancia egyik oka bizonyos receptor alegységek megosztott használata, ami azonos jelátviteli útvonalak aktiválódását vonja maga után. A közös receptor alegység típusa alapján a citokineket családokba/csoportokba sorolhatjuk. Az IL-6-típusú citokinek családjába a névadó IL-6-on kívül – legtágabb értelmezésben – 10 másik citokin tartozik. Ez utóbbiak az IL-11, LIF (leukémia gátló faktor), OSM (onkosztatin M), CNTF (ciliáris neurotróf faktor), CT-1 (kardiotropin-1), CLC (kardiotropin-szerű citokin), NP (neuropoetin), IL-27, IL-31, IL-35 és IL-39. Hatásukat a plazmamembránban található multimer receptor komplexek közvetítik a sejt belseje felé. Az IL-31 kivételével a receptor komplexek közös alkotóeleme a jelátvitelben közvetlenül résztvevő glikoprotein 130 (gp130) alegység (Heinrich et al., 2003; Rose-John, 2018).

A teljes, funkcionális receptor komplex felépítésében a citokin típusától függően a gp130 lánc homodimerek (IL-6, IL-11) vagy egy másik jelátvivő alegységgel alkotott heterodimerek formájában (LIF, OSM, CNTF, CT-1, IL-27, NP) vesz részt. A gp130 homo- vagy heterodimerek mellett az IL-6, IL-11, CNTF, CLC, CT-1 és NP receptorának alkotóeleme egy, a jelátvitelre nem képes, ugyanakkor a ligandum specifikus megkötéséhez szükséges alegység is. Az IL-27, IL-35 és IL-39 felépítésében a gp130 mellett az IL-12 típusú citokinekre jellemző receptor alegységek vesznek részt, emiatt mind az IL-6 típusú, mind pedig az IL-12 típusú citokinek családjába besorolhatók. Receptorának összetételét tekintve az IL-31 kivételt képez: az IL-31R komplex felépítésében az OSM receptor β lánc, valamint a citokin specifikus, gp130-szerű IL-31R α lánc vesz részt. Besorolása emiatt változó: az irodalmi hivatkozások jelentős része az IL-31-et formálisan nem sorolja az IL-6 citokin család tagjai közé (Metcalf et al., 2020).

A gp130 alegység önmagában, a receptor komplexek egyéb tagjainak hiányában nem aktiválható a természetben előforduló citokinek által. A gp130 alegység minden sejten kifejeződik, míg a többi alegység expressziós mintázata jóval korlátozottabb. Ez utóbbiak kifejeződése határozza meg, hogy az adott sejtípus mely IL-6 típusú citokin(ek)re válaszol (Carbia-Nagashima & Arzt, 2004).

2.1.2.2. Az IL-6 szerkezete és biológiai funkciói

A humán IL-6 egy 21-26 kDa molekulatömegű glikoprotein, mely 184 aminosavból épül fel. A citokin molekulatömege a cukorrészek nélkül 20 kDa. Négy jól elkülöníthető α -hélixből (A, B, C és D) és az azokat összekötő szakaszokból áll, valamint tartalmaz két potenciális N-glikolizációs helyet és négy cisztein csoportot. Három jól körülhatárolt receptor kötőhellyel rendelkezik. A receptor kötőhely I. az A és D hélixen található, és az IL-6R α alegységgel létesít kölcsönhatást, kialakítva ezzel az IL-6/IL-6R α bináris komplexet. A receptor kötőhely II. elősegíti az IL-6/IL-6R α komplex kapcsolódását a gp130 alegységhez, míg a III. kötőhely felelős az IL-6/IL-6R α /gp130 receptor komplex aktiválódásáért (2. ábra) (Boulanger et al., 2003; da Silva Mesquita et al., 2020; Heinrich et al., 2003).



2. ábra: Az IL-6 szerkezete

Az IL-6 négy α -hélixből épül fel és három jól elkülöníthető receptor kötőhellyel rendelkezik (Heinrich et al., 2003).

Az IL-6-t először az 1980-as években azonosították T-sejt eredetű, B-sejt differenciációt indukáló faktorként. Később feltárták, hogy a B-sejt stimuláló faktornak elnevezett citokin több más, eltérő folyamatot szabályozó szolubilis faktorra is azonos (Hirano, 1998; Kishimoto et al., 1992). Ma már ismert, hogy az IL-6 egy pleiotróp citokin, amelynek biológiai aktivitása igen széles spektrumot fed le, beleértve az egyedfejlődés, az immunrendszer, a regeneratív folyamatok, az anyagcsere, a csont homeosztázis, a szív- és érrendszeri védelem, valamint az idegi funkciók szabályozását (Schett, 2018). Több sejtféleség termeli, így pl. neutrofil granulociták, monociták, makrofágok, fibroblasztok, endotél sejtek, aktivált T- és B-sejtek, valamint egyes tumorsejtek (Schmidt-Arras & Rose-John, 2016).

A II. táblázatban néhány kiemelt példát mutatok be az IL-6 által szabályozott biológiai folyamatokra. Az IL-6 által szabályozott egyik fontos területet a gyulladásos folyamatok jelentik. A fertőzések vagy sérülések következtében kialakult szövetkárosodás, gyulladás esetén az IL-6 szintézise gyakorlatilag azonnal fokozódik, ami az akut fázis reakciók és a vérképzés serkentésén keresztül segíti a gazdaszervezet védekezését (Tanaka & Kishimoto, 2014; Wang & Sun, 2014). Az IL-6 emelkedett szintje fiziológiás körülmények között átmeneti jelenség. A nem megfelelően szabályozott IL-6 termelés, valamint az IL-6 jelátvitel egyéb rendellenességei gyulladással összefüggő kóros állapotok, mint pl. krónikus elhízás, inzulin rezisztencia, gyulladásos bélbetegségek, gyulladásos artritisz és szepszis kialakulásához vezethetnek. Széles spektrumú biológiai aktivitása miatt az IL-6 jelátvitel zavara számos más betegség kialakulásában kockázati tényező, így pl. autoimmun betegségek, kardiovaszkuláris problémák stb. kialakulását okozhatja (Hirano, 2021; Naugler & Karin, 2008).

II. táblázat: IL-6 által szabályozott folyamatok

Célsejt	IL-6 hatása	Folyamat
monocita	makrofág irányú differenciáció serkentése	antigén prezentáló sejt homeosztázis
	dendritikus sejt irányú differenciáció gátlása	
mononukleáris sejtek	szöveti infiltráció és aktiválódás serkentése	gyulladásos leukocita mintázat kialakítása
neutrofil granulociták	szöveti infiltráció gátlása	
aktivált B-sejtek	plazmasejt differenciáció serkentése	immunglobulin szintézis
naív CD4⁺ T-sejtek	follikuláris T _H sejt differenciáció serkentése	
naív CD4⁺ T-sejtek	T _H 17 differenciáció serkentése	patogénspecifikus immunválasz, gyulladás
	indukált T _{reg} -sejt differenciáció gátlása	
hepatocita	„pozitív” akut fázis fehérjék termelésének serkentése (pl. C reaktív fehérje, fibrinogén, stb.)	gyulladás
	„negatív” akut fázis fehérjék termelésének gátlása (pl. albumin, transzferrin, stb.)	
	hepatocita proliferáció serkentése	májregeneráció
fibroblaszt	VEGF termelés serkentése	angiogenezis
hematopoietikus őssejtek	vérsjtek fejlődése	hematopoiezis
	differenciálódás elkötelezett progenitor sejtekké	

T_H: segítő T-sejt, **T_{reg}**: szabályozó T-sejt, **VEGF**: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Mitani et al., 2000; Schett, 2018; Schmidt-Arras & Rose-John, 2016; Tanaka & Kishimoto, 2014)

Napjainkra bizonyított, hogy az IL-6 a daganatok kialakulásában is kitüntetett szerepet játszik. Krónikus gyulladás során megnő a karcinogenezis esélye: a gyulladásos állapotot fenntartó mediátorok, így az IL-6, segítik ezt a folyamatot (Multhoff et al., 2012). Az IL-6 túltermelődését több daganattípus esetén kimutatták, így pl. kolorektális karcinómában, emlőtumorban, prosztatata tumorban, különböző limfómákban, valamint az általunk vizsgált uveális melanómában is. A megemelkedett IL-6 szint olyan összetett tumormikrokörnyezetet alakít ki, mely az tumorképződés folyamatának minden fontos sajátosságára kihat. A tumorsejtekre gyakorolt közvetlen hatása mellett, a strómasejtekre, endotélsejtekre és különböző immunsejtekre gyakorolt hatásán keresztül, indirekt módon is hozzájárul az onkogenezishez. Az IL-6 serkenti a tumorsejtek túlélését és proliferációját, gátolja az apoptózist, hozzájárul a sejtm metabolizmus átalakulásához. Elősegíti az angiogenezist, a tumorok invazivitását és metasztázis képzést, valamint a tumorelles immunválasz elkerülését is (Fisher et al., 2014; Kumari et al., 2016; Naugler & Karin, 2008). Fontos megemlíteni, hogy az IL-6 jelátvitel a T-sejtes tumorelles immunválasz mobilizálása révén bizonyos esetekben tumorelles aktivitást is kifejthet (Fisher et al., 2014).

Az IL-6 megemelkedett szintjét uveális melanómák esetén is kimutatták. Pozitív korrelációt találtak az IL-6 koncentráció, valamint a tumorok mérete, illetve a makrofágok és T_{reg} sejtek tumor infiltrációjának mértéke között (Cheng et al., 2019; Dunavoelgyi et al., 2012). Továbbá, fokozza a tumorsejtek növekedését és proliferációját, valamint elősegíti a VEGF-függő angiogenezist is. Az emelkedett IL-6 koncentráció közvetlenül hozzájárul egyéb angiogén citokinek rendellenes expressziójához is, melyek elősegítik a metasztázis képzést. Elképzelhető, hogy a makrofágok és a tumorsejtek között kialakuló párbeszéd tovább serkenti az IL-6 (és egyéb) mediátorok termelődését (Bronkhorst & Jager, 2012; Cools-Lartigue et al., 2004; Ly et al., 2010; Nagarkatti-Gude et al., 2012).

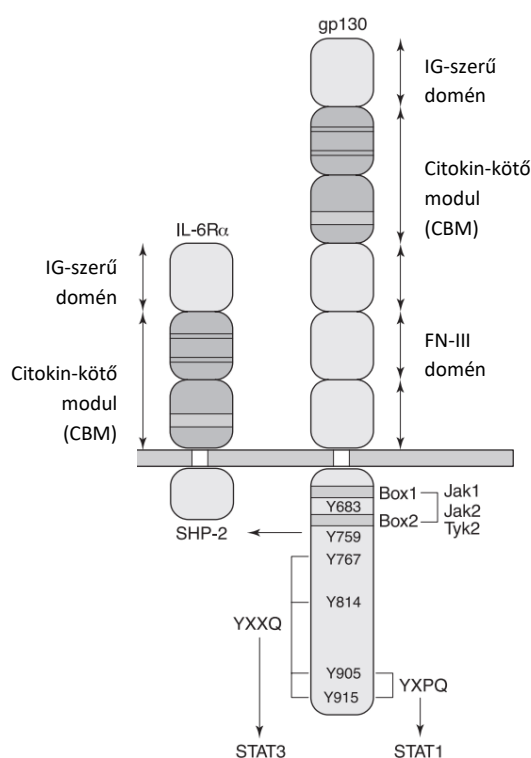
A tumormikrokörnyezetben megemelkedett IL-6 koncentráció a STAT3 jelátviteli útvonal rendellenes szabályozását eredményezi. A konstitutívan hiperaktivált STAT3 elősegíti a daganatok progresszióját a proto-onkogén c-myc és sejtciklus-szabályozó ciklin D1 célgének transzkripcióján keresztül. Az IL-6 a tumorsejtek túlélését is támogatja, ugyanis a STAT3 aktiváción keresztül anti-apoptotikus fehérjék, így a Bcl-2, a Bcl-2 homológ antagonist/gyilkos (Bak) fehérje, az extra nagy B-sejtes limfóma (Bcl-XL) fehérje és a survivin expresszióját fokozza (Fisher et al., 2014).

A hosszú távú IL-6 expozíció csökkenti a sejtek közötti adhéziót és beindítja epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) programot, ezáltal elősegíti az UM-sejtek migrációját és invázióját. A konstitutívan aktivált STAT3 közvetlenül kötődik a *JunB* promoterhez és

fokozza az IL-6 által kiváltott EMT programban kritikus szerepet játszó a JunB transzkripció faktor expresszióját, amely a konstitutív STAT3 aktivációval együtt egyéb, az EMT-t elősegítő faktorok, így többféle mátrix metalloproteináz (MMP-2, MMP-14 és MMP-19) expresszióját is kiváltja (Gong et al., 2018).

2.1.2.3. Az IL-6R szerkezete

Az IL-6R komplex a 130-160 kDa molekulatömegű gp130, valamint a 80 kDa nagyságú IL-6R α (gp80, CD126) alegységből épül fel (3. ábra). A gp130 molekulatömegének változatossága a különböző glikolizációs mintázat következménye. A gp130 lánc 896 aminosavból épül fel, ebből az extracelluláris régió 597, a transzmembrán rész 22, míg a citoplazmatikus régió 277 aminosavból áll. Az IL-6R α 449 aminosavból épül fel; az extracelluláris régiót 339, a transzmembrán részt 28, míg a citoplazmatikus régiót 82 aminosav alkotja (Hibi & Hirano, 2000).



3. ábra: Az IL-6R α és a gp130 receptor alegységek domén felépítése

Mindkét alegység extracelluláris része egy-egy immunglobulin (Ig) szerű doménből és citokin-kötő modulból (CBM) épül fel. A gp130 alegység további három III. típusú fibronectin (FN-III) domént is tartalmaz. A gp130 receptor alegység intracelluláris részén található Box1 és Box2 motívumokhoz intracelluláris tirozin kinázok kapcsolódnak. A gp130 intracelluláris részén hat tirozin oldallánc (Y) található, az ábrán feltüntetett pozíciókban, amelyek foszforilált formában (az Y683 kivételével), a STAT1 és 3 transzkripció faktorok, valamint az SHP2 fehérje tirozin foszfatáz számára biztosítanak kapcsolódási helyet (Hibi & Hirano, 2000).

Mindkét alegység az I. típusú citokin receptorok családjába tartozik, ennek megfelelően extracelluláris részükön megtalálható a két III. típusú fibronectin-szerű (FN-III) doménből felépülő citokin-kötő modul (CB modul, CBM). Az első, azaz N-terminális, FN-III domén 2 pár konzervált ciszteint tartalmaz, amelyeket diszulfid hidak kapcsolnak össze. Az ugyancsak az erősen konzervált WSXWS szakasz pedig a második, azaz C-terminális, FN-III doménben található. Ugyancsak közös elem a két alegység felépítésében az N-terminális végen elhelyezkedő immunoglobulin-szerű (Ig) domén (Hirano, 1998; Metcalfe et al., 2020).

Az IL-6R α részéről a citokin megkötésében csak a CB modul vesz részt, az N-terminális Ig-szerű domén jelenléte ehhez nem szükséges. Ugyanakkor ez utóbbi domén feltételezhető szerepet játszik az IL-6R α lánc sejtfelszínre történő kijutásában (trafficking). A gp130 esetén a CB modul mellett az N-terminális Ig-szerű domén is közvetlenül részt vesz az IL-6 felismerésében és megkötésében. Ezek a domének a gp130 lánc aktiválódásában is kritikusak (Metcalfe et al., 2020).

A gp130 extracelluláris régiója a fentiekén kívül további három három ismétlődő FN-III domént tartalmaz (Hibi & Hirano, 2000), amelyek az IL-6R α láncban nincsenek jelen. Ezek a membránközeli domének az IL-6 felismerésében és megkötésében nem vesznek közvetlenül részt. Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján jelenlétük a gp130 jelátvivő szerkezetének kialakulásához, s így az intracelluláris kinázok megfelelő orientációjú kapcsolódásához szükséges (Lupardus et al., 2011; Skiniotis et al., 2005).

A gp130 hosszú intracelluláris régiójában a membránhoz közeli, az I. típusú citokin receptor család számos tagjában megtalálható, konzervált Box1 és Box2 motívumok a Jak1, Jak2 és tirozin kináz 2 (Tyk2) citoszolikus tirozin kinázok számára biztosítanak kapcsolódási helyet. Emellett a gp130 receptor alegység citoplazmatikus része tartalmaz öt tirozin aminosavat, melyek foszforilációja SH2 doménnel rendelkező molekulák kapcsolódása révén az extracelluláris jel továbbításának kulcsfontosságú lépése. Egyrészt szükséges a STAT3 és STAT1 transzkripciós faktorok kapcsolódásához és következményes aktiválódásához, másrészt egyéb jelátviteli molekulák kötődését is lehetővé teszik. Nevezetesen a STAT3 kapcsolódásához a 767-es, 814-es, 905-ös és 915-ös pozícióban elhelyezkedő tirozinok egyikének foszforilációja, míg a STAT1 kapcsolódásához a 905-ös vagy 915-ös tirozinok foszforilációja szükséges (Hibi & Hirano, 2000). A felsorolt 4 tirozin mindegyike ún. YXXQ konszenzus szekvenciában van jelen, azaz a tirozinhoz képest a +3-as pozícióban egy glutamin található. A 905-ös és 915-ös tirozin esetén a +2 pozícióban lévő aminosav is meghatározott, itt egy prolin található (YXPQ). A 759-es tirozin foszforilációja az SH2-domén tartalmú fehérje tirozin foszfatáz-2 (SHP2) tirozin foszfatázzal való kölcsönhatás kialakítása révén a gp130 és

mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonal közötti kapcsolatot biztosítja, másrészt a citokin jelátvitelt elnyomó fehérje 3 (SOCS3) is ezen a foszfortirozin oldalláncon keresztül kapcsolódik be a jelátviteli komplexbe és fejt ki negatív szabályozó hatását (2.1.2.4. fejezet). Az intracelluláris régió egy hatodik tirozint is tartalmaz (Y683), ugyanakkor ez nem vesz részt az előbbieken leírt jelátviteli lépésekben (Takizawa et al., 2003).

Az IL-6R α viszonylag rövid intracelluláris doménnel rendelkezik, amely a jelátvitelben nem játszik szerepet (Hibi & Hirano, 2000). Fontos megemlíteni, hogy mindkét alegység intracelluláris régiója a fehérjék internalizációjában kritikus motívumokat hordoz (Flynn et al., 2021).

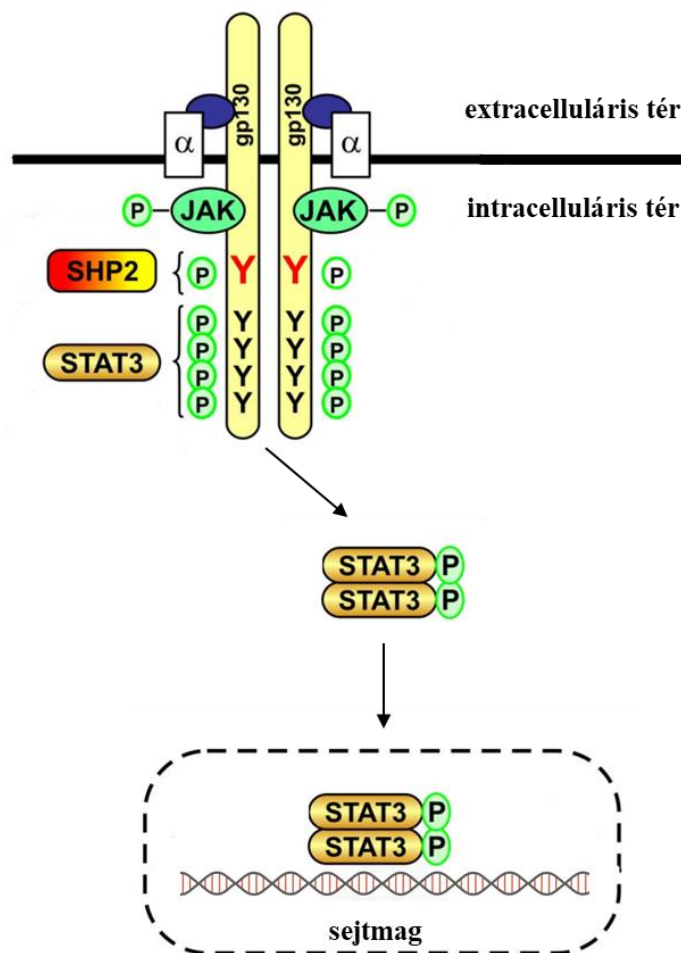
Míg a gp130 minden sejten kifejeződik, addig az IL-6R α expressziója fiziológiás körülmények között néhány sejttípusra korlátozódik, így hepatocitákra, epitél sejtekre, illetve egyes leukocitákra. Ugyanakkor az IL-6 biológiai hatása sokkal több célsejtet érint, amelynek hátterében az áll, hogy az IL-6R α alegység nemcsak membránkött, hanem szolubilis formában (sIL-6R α) is rendelkezik biológiai aktivitással. Az sIL-6R α általában a fehérje proteolitikus hasítása, ritkábban alternatív splicing révén alakul ki. Ennek a jelátviteli módozatnak a révén megnő az IL-6-ra válaszoló sejttípusok száma, ami nagymértékben hozzájárul a citokin változatos biológiai funkcióihoz (Rose-John, 2012)

2.1.2.4. Az IL-6 által kiváltott STAT3 jelátvitel és annak szabályozása

Az IL-6 által kiváltott STAT3 aktiváció első lépéseként a citokin az IL-6R α alegység CB moduljához kötődik. Az így kialakult IL-6/IL-6R α dimer kapcsolódik a gp130 alegységhez. A kapcsolatot az IL-6 hozza létre, amelynek megkötésében a gp130 részéről a CB modul mellett az N-terminális, Ig-szerű domén is részt vesz. A kötődés hatására a gp130 alegységek konformációja megváltozik, amelynek következtében a heterotrimer a gp130 alegységen keresztül dimerizálódik. Az így kialakult hexamer komplexben a két gp130 alegység intracelluláris része egymás közelébe kerül, ami lehetővé teszi a konstitutívan kapcsolódó Jak kinázok keresztfoszforilációját.

A Jak kinázok a gp130 citoplazmatikus oldalán elhelyezkedő tirozin oldalláncokat is foszforilálják. Az így kialakuló foszfortirozin (pTyr) motívumok molekuláris dokkolóként szolgálnak a monomer, nem foszforilált STAT3, illetve a STAT1 fehérjék számára, azok SH2 doménjén keresztül. A STAT3 dokkolásában a 767-es, 814-es, 905-ös és 915-ös pozícióban elhelyezkedő pTyr motívumok vesznek részt. Miután a STAT3 „toborzása” megtörtént, maga a transzkripciós faktor is az aktív Jak kinázok szubsztrátjává válik: bekövetkezik a 705-ös pozícióban elhelyezkedő tirozin oldallánc foszforilációja. Ezt a STAT3 homodimerizációja

követi, illetve egyes esetekben STAT1/STAT3 heterodimerek is képződhetnek. A dimerekben a STAT fehérjék kapcsolódását a pTyr és az SH2-domének közötti, ún. reciprok kölcsönhatás hozza létre. A foszforilált dimerek az α és β importin fehérjék közreműködésével a nukleáris póruskomplexen keresztül a sejtmagba transzlokálódnak, ahol kötődnek a specifikus STAT DNS válaszzelemekhez és közvetlenül szabályozzák célgénjeik expresszióját (4. ábra) (Buettner et al., 2002; Jarnicki et al., 2010; Johnston et al., 2018; Xiong et al., 2014).



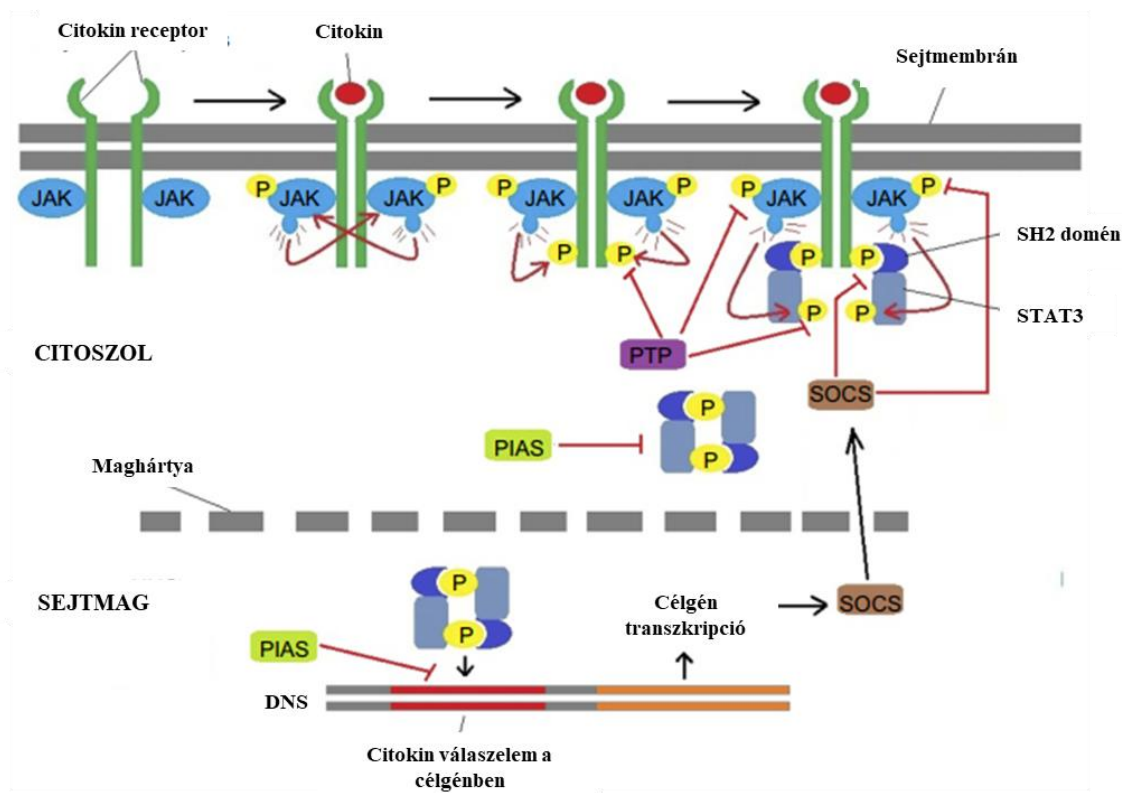
4. ábra: Az IL-6 által kiváltott Jak/STAT3 jelátvitel útvonal főbb lépései

Az IL-6 kötődése az IL-6R α alegységhez előidézi a gp130 alegység kapcsolódását a receptor komplexhez. A gp130 alegységhez konstitutívan kötődő Jak citoszolikus tirozin kinázok gyors aktiválódást követően foszforilálják a gp130 tirozin oldalláncait, mely a STAT3 toborzását és a Tyr705 aminosav foszforilációját eredményezi. A pTyr-STAT3 fehérjék dimerizálódnak, majd a sejtmagba transzlokálódnak, ahol kötődnek a specifikus DNS válaszzelemekhez a célgének promotereiben, ezáltal szabályozva azok transzkripcióját (Jarnicki et al., 2010).

A fentiekben vázolt folyamat az ún. cisz-IL-6 jelátvitelt mutatja be, amikor a gp130 és az IL-6R α ugyanazon sejten fejeződnek ki. Mint említettem, az IL-6R α szolubilis formában is képes a citokint megkötni, majd egy membránkötött gp130 alegységgel kapcsolódva játvitelt

indukálni (transz-jelátvitel). Ezt követően a jelátvitel a korábban felvázoltak szerint történik (Rose-John, 2021).

A legtöbb citokin indukált folyamatra jellemzően a STAT3 aktiváció fiziológias körülmények között gyors és tranzienst folyamat. A patológiás elváltozások megelőzéséhez elengedhetetlen az aktiváció időtartamának és erősségének szoros kontrollja, amelyet negatív regulátorok összetett hálózata tesz lehetővé. A negatív szabályozók különböző szinteken hatnak, beleértve az aktív STAT3 defoszforilációját, gátló fehérjékkel történő kölcsönhatását, valamint proteasomális degradációját. Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal negatív szabályozói közé tartoznak az aktivált STAT gátló fehérjék (PIAS), a SOCS fehérjecsald tagjai, valamint különféle fehérje tirozin foszfatázok (PTP) (5. ábra).



5. ábra: Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal negatív szabályozása

Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal negatív szabályozásában három fehérjecsald vesz részt. A SOCS fehérjék gátolják a STAT3 kapcsolódását az IL-6/IL-6R receptor komplexhez. A PTP-k a tirozin oldalláncok defoszforilálásával megszüntetik a STAT3 aktivációt. A PIAS fehérjék gátolják a STAT3-DNS kapcsolat kialakulását (Wu et al., 2019).

A PIAS fehérjék családjába öt különböző fehérje tartozik: PIAS1, PIAS α , PIAS β , PIAS3, PIAS4). Bár eredetileg a STAT gátló hatásukról kapták nevüket, más transzkripciós faktorok szabályozásában is részt vesznek. A STAT3 útvonal negatív szabályozásában a PIAS3 szerepét szükséges kiemelni. A PIAS fehérjék három fő mechanizmussal gátolhatják a STAT

aktivitást. Egyrészt képesek kötődni az aktivált STAT homo- vagy heterodimerekhez, amivel megakadályozzák a STAT-DNS kölcsönhatást. Emellett elősegítik a transzkripció ko-represszorok célgénekhez történő toborzását. A harmadik lehetséges mechanizmus során a PIAS fehérje SUMO-ligáz aktivitása révén egy SUMO-oldalláncot kapcsol a transzkripció faktorhoz, amelyet felismerő magi tirozin foszfatáz defoszforilálja az aktivált transzkripció faktort (Dimri et al., 2017; Heppler & Frank, 2017; Wu et al., 2019).

A SOCS fehérjecsaldának nyolc tagja ismert, ezek közül a SOCS1-3 és a citokin-indukált SH2-tartalmú fehérje (CIS) Jak/STAT jelátvitelben betöltött negatív szabályozó funkciója viszonylag jól karakterizált, míg a többi tag szerepe kevésbé feltárt. A SOCS fehérjék expressziós szintje stimuláció hiányában viszonylag alacsony. A megfelelő stimulus által aktivált STAT a SOCS fehérjék génjeinek átíródását is fokozza, így expressziójuk megemelkedik. A SOCS fehérjék SH2 doménjük révén kapcsolódnak a gp130 alegység pTyr motívumaihoz, gátolva ezzel az STAT3 kötődését kompetitív gátlás és/vagy sztérikus gátlás révén, ez még pontosan nem tisztázott. A SOCS1 és SOCS3, ugyancsak SH2 doménjük közreműködésével, közvetlenül kapcsolódhat az aktivált Jak kinázokhoz, ezáltal gátolva azok enzimatisz aktivitását. A SOCS fehérjék C-terminális végéhez kapcsolódó E3 ubikvitin ligáz komplex a STAT jelátviteli út vonal számos tagjának ubikvitinációját és következményes proteozómális degradációját okozza (Dimri et al., 2017; Heppler & Frank, 2017).

A tirozin foszfatázok az aktivált STAT3 tirozin oldalláncának defoszforilációja révén járulnak hozzá a STAT3 jelátvitel gyengítéséhez. Hét különböző PTP közreműködését mutatták ki a STAT3 inaktivációjában, melyek között receptor típusú, transzmembrán, illetve nemreceptor típusú, citoszolikus PTP egyaránt megtalálható. Ez utóbbiak közé tartozik az SHP2, amelynek szerepét elsőként azonosították az IL-6 kiváltott STAT3 aktiváció negatív szabályozásában. A gyakorlatilag minden sejtben kifejeződő SHP2 két SH2 doménnel rendelkezik. Inaktív állapotban az N-terminális SH2 domén sztérikusan gátolja az enzim aktív centrumának kölcsönhatását a potenciális szubsztátokkal. IL-6 stimulációt követően az SH2 domének révén az SHP2 kapcsolódhat az aktivált gp130 alegységhez, amelynek hatására konformációja megváltozik, elérhetővé válik az aktív centrum. A Jak kinázok a jelátviteli komplexbe becsatlakozó SHP2-t is foszforilálják a C-terminális régióban, ami a fehérje saját SH2 doménjeihez kapcsolódva fenntartja az enzim aktív állapotát. A T-sejt fehérje tirozin foszfatáz (45 kDa) (TC45) nemreceptor típusú PTP szintén kifejeződik a legtöbb sejtben, ugyanakkor az SHP2-vel ellentétben, stimuláció hiányában elsősorban a sejtmagban dúsul fel. Stimuláció hatására a mag és a citoszol között „közlekedik”, így mind a magban, mind pedig a

citoszolban képes a pTyr-STAT3 defoszforilációjára (Heinrich et al., 2003; Kim et al., 2018; Wu et al., 2019).

2.1.2.5. STAT3 szerin foszforilációja

A STAT3 (és a többi STAT) fehérje tirozin foszforilációja a klasszikus Jak/STAT jelátviteli útvonal alapvető feltétele, mivel lehetővé teszi a STAT3 homo- vagy heterodimerek kialakulását. Mint láthattuk (2.1.1. fejezet), a STAT3 a 727-es pozícióban elhelyezkedő szerin aminosav oldalláncon is foszforilálható. A szerin foszforilációban stimulustól és sejttípustól függően több különböző szerin/treonin kináz vehet részt. Egyebek mellett feltárták a mitogén aktivált fehérje (MAP) kinázok, a protein kináz C-delta (PKC δ), az emlős rapamicin célpont kináz (mTOR), valamint a ciklin függő kináz 1 (Cdk1) közreműködését (Decker & Kovarik, 2000) (Decker & Kovarik, 2000; Demaria et al., 2014).

A szerin oldalláncot tartalmazó P(M)SP motívum a fehérje TAD régiójában helyezkedik el, így a szerin foszforiláció lehetőséget ad a STAT3 transzkripciós aktivitás befolyásolására (Decker & Kovarik, 2000). A rendelkezésre álló adatok alapján a szerin foszforiláció pozitív és negatív szabályozó szerepet egyaránt elláthat a kanonikus STAT3 jelátviteli útvonalban, ugyanakkor a hatásmechanizmus még nem minden részletében tisztázott és az adatok sokszor ellent mondanak egymásnak. Kimutatták, hogy a szerin oldallánc foszforilációja szükséges a maximális transzkripciós aktivitás eléréséhez, ugyanakkor a transzkripciós faktor DNS kötését nem befolyásolja (Wen et al., 1995). Más adatok szerint a szerin foszforiláció fokozza a transzkripciós faktor kötődését a DNS-hez, bár pontmutációs kísérletekkel nem sikerült megfelelően alátámasztani ezt a feltételezést (Ng et al., 2006). Ugyanakkor arra vonatkozóan is van adat, miszerint a szerin foszforiláció gátlása fokozza a transzkripciós faktor DNS-kötését (Shi et al., 2006).

Szerin-kináz-gátlók használatával kimutatták, hogy a szerin oldalláncon történő foszforiláció modulálja a STAT-ok transzkripciós aktivitását, valamint hatással van a tirozin foszforilációra is. Több adat utal arra, hogy a szerin foszforiláció közvetve, koaktivátor fehérjék (pl. CREB-kötő fehérje, magreceptor koaktivátorok (NcoA) és a pozitív transzkripciós elongáló faktor (Ptefb)) toborzása révén fokozza a STAT3 transzkripciós aktivitását és erősíti a citokin indukált génexpressziót (Chung et al., 1997; Courapied et al., 2010). Ugyanakkor arra vonatkozó adatok is vannak, miszerint a szerin foszforiláció elősegíti a pTyr-STAT3 defoszforilációját, ezáltal lerövidíti a STAT3 transzkripciós aktivitás időtartamát (Wakahara et al., 2012). Mindezek alapján a szerin foszforiláció feltételezhetően a STAT3 optimális transzkripciós aktivitásának fenntartásához szükséges.

Sokáig úgy gondolták, hogy a szerin foszforiláció a tirozin foszforilációt követő, ún. másodlagos esemény, amely kizárólag a transzkripció aktivitás szabályozásában játszik szerepet. Napjainkra egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a szerin foszforiláció lényegesen összetettebb szerepet játszik a STAT3 funkció szabályozásában és a tirozin foszforilációtól függetlenül is előfordulhat (Sakaguchi et al., 2012). Melanóma sejtekben kimutatták a pSer-STAT3 konstitutív jelenlétét tirozin foszforiláció hiányában is. Emellett a tumor promotor 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát (TPA) jelentősen fokozta a pSer-STAT3 szintjét anélkül, hogy tirozin foszforilációt indukált volna.

A STAT3 szerin foszforilációja kritikus szerepet játszik a sejtciklus M-fázisának kezdeti szakaszában. A Cdk1/ciklin B1 komplex által közvetített STAT3 szerin foszforiláció a mitózis kezdetekor elnyomja a p21 és p27 Cdk1 inhibitorok expresszióját, ami biztosítja a Cdk1/ciklin B1 komplex aktív állapotának fenntartását. Amint a sejtek kilépnek az M-fázisból a ciklin B ubikvitinációja és következményes degradációja eredményeként a Cdk1 aktivitása csökken, így a szerin foszforiláció helyett a pSer-STAT3 defoszforilációja válik dominánssá. A p21 és p27 expressziója fokozódik, ami tovább gátolja a Cdk1 aktivitását negatív visszacsatolás révén (Shi et al., 2006).

A kanonikus STAT3 funkciók ellátásához nélkülözhetetlen a STAT3 magi transzlokációja, amelyet megelőz a transzkripció faktor tirozin foszforilációja. A szerin foszforilációnak a magi transzlokációban játszott szerepével kapcsolatban több egymásnak ellentmondó közlemény jelent meg az elmúlt időszakban. A P(M)SP motívum eltávolítása nem befolyásolta a STAT3 sejten belüli elrendeződését (Decker & Kovarik, 2000). Ugyanakkor a pSer-STAT3-at konstitutívan kifejező krónikus limfoid leukémia (CLL) sejtekben kimutatható volt a STAT3 magi transzlokációja tirozin foszforiláció hiányában is. Számos STAT3 szabályozott túlélési és proliferációs gén átíródását is megfigyelték, ami arra utal, hogy a pSer-STAT3 a tirozin oldallánc foszforilációjától függetlenül is kötődhet a DNS-hez és génátíródást válthat ki (Hazan-Halevy et al., 2010).

A szerin foszforiláció szerepére vonatkozó ellentmondásos adatok – legalábbis részben – annak tudhatók be, hogy azt több különböző stimulus és így jelátviteli út is kiválthatja. A STAT3 szerin foszforilációjának és az azt követő molekuláris mechanizmusok alapos ismerete rávilágíthat azokra a folyamatokra, melyek meghatározzák a szerin foszforiláció negatív és pozitív szabályozó szerepét a STAT3 funkciókban egészséges és daganatos sejtekben egyaránt.

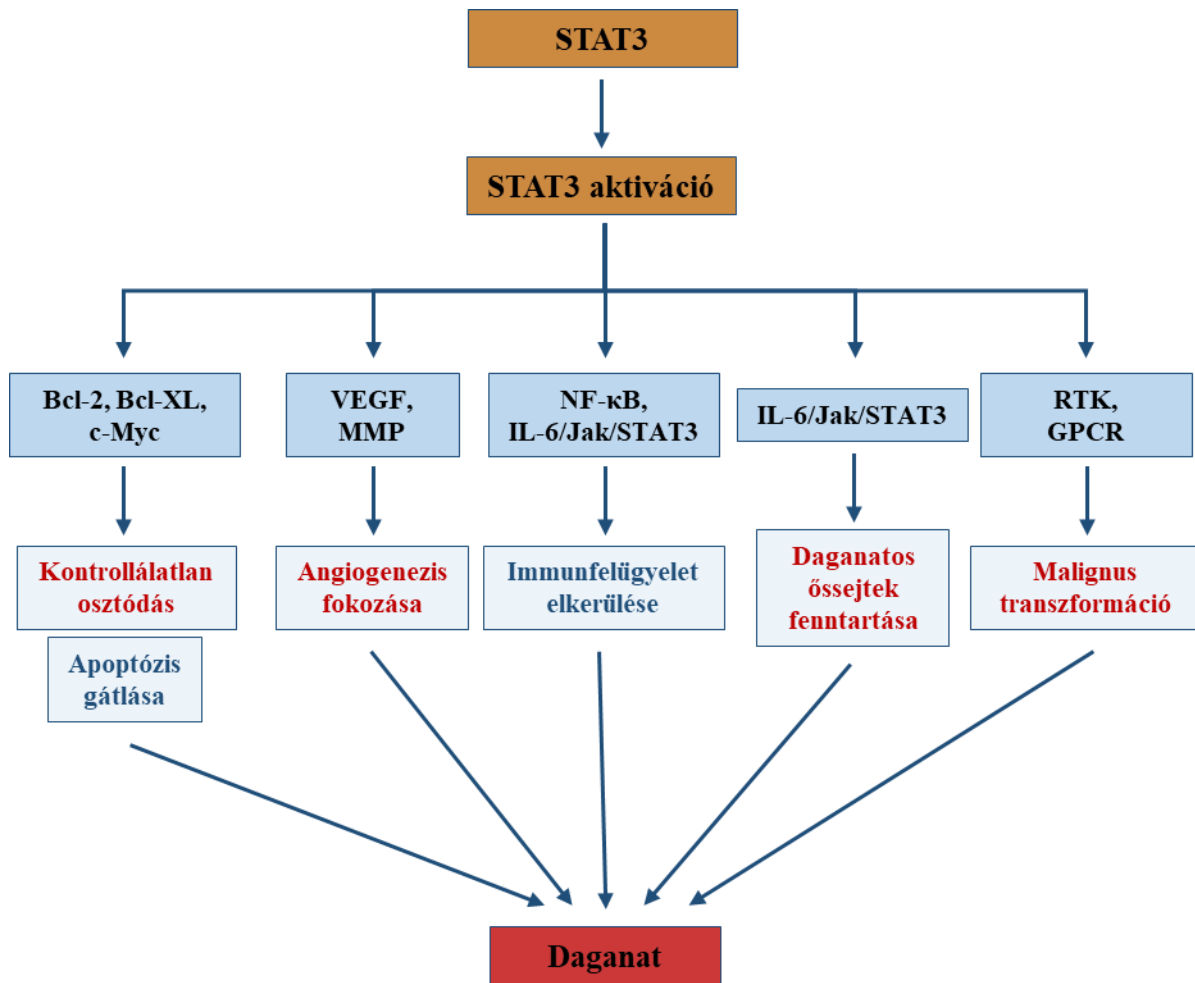
A STAT3 szerin foszforilációja nemcsak a kanonikus STAT3 jelátvitelben játszik szerepet. Részt vesz a mitokondriális STAT3 (mitoSTAT3) funkció szabályozásában is: míg a mitoSTAT3 működése független a transzkripció faktor tirozin foszforilációjától, a szerin

foszforiláció kritikus az elektron transzport lánc mitoSTAT3 által történő szabályozásában. A transzkripció faktor szerin foszforilációja feltehetően a mitokondriális import előtt, a citoszólban következik be (Gai et al., 2021; Guanizo et al., 2018).

2.1.3. STAT3 szerepe az onkogenezisben

Az aktivált STAT3 élettani hatása rendkívül széleskörű, egyaránt szabályozza a sejtek differenciálódását, proliferációját, túlélését és halálát. Mivel a STAT3 sokféle fiziológiai folyamatban játszik központi szerepet, aktivációja normál sejtekben átmeneti és szorosan kontrollált. Ezzel szemben a szolid és hematológiai tumorok jelentős hányadában kimutatták a STAT3 tartósan fennálló aktivációját, ideértve a leukémiát, az emlő, a prosztata és a hasnyálmirigy daganatos megbetegedéseit, valamint a különböző melanómákat is (Huang, 2007; Tolomeo & Cascio, 2021; Yu et al., 2014).

A kanonikus STAT3 jelátviteli útvonal számos célgénjét azonosították, melyek kontrollálatlan expressziója és megváltozott szabályozása kritikus szerepet játszik különféle daganatos megbetegedések kialakulásában. A tumoros transzformáció alapvető jellegzetességei a következőképp foglalhatók össze: (1) csökken a növekedési faktor igény, a sejtproliferáció autokrin jelátvitel révén valósul meg; (2) érzéketlenség a proliferációt gátló jelekre; (3) apoptózis elkerülése; (4) korlátlan replikációs potenciál; (5) fokozott angiogenezis; (6) szöveti invázió és metasztázis; (7) megváltozott metabolizmus; (8) immunválasz elkerülése (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). A konstitutív STAT3 aktiváció legalább három ilyen jellegzetességet, a proliferációt, a túlélést és angiogenezist is elősegíti, de mára már bizonyított, hogy szerepet játszik az EMT folyamatában és a metasztázisok képzésében is (6. ábra) (Gong et al., 2018).



6. ábra: A STAT3 célgénnek szerepe a tumoros transzformációban

A STAT3 tartósan fennálló aktivációja számos proto-onkogén fokozott expresszióját eredményezi, melyek olyan jelátviteli útvonalak hálózatát indítják be, ami végül tumoros transzformációhoz és daganatok kialakulásához vezet (Xiong et al., 2014).

NF-κB: nukleáris faktor-kappa B; **RTK:** receptor tirozin kináz; **GPCR:** G-fehérje kapcsolt receptor

A STAT3 angiogenezisben betöltött szerepét először akkor igazolták, amikor a VEGF- α -ról kiderült, hogy a STAT3 közvetlenül szabályozza a VEGF- α gén átíródását egér melanóma sejtekben. A STAT3 közvetett módon is hozzájárul a VEGF- α transzkripciójához: fokozza a hipoxia-indukálható faktor 1 α (HIF1 α) expresszióját, amely a VEGF- α gén egyik legfontosabb transzkripciós faktora (Bournazou & Bromberg, 2013; Chonov et al., 2019).

A STAT3 aktivációja nélkülözhetetlen az endotél sejtek proliferációjához, migrációjához és új mikrovaszkuláris struktúrák kialakításához. A STAT3 túlzott aktivitása egyértelmű pozitív korrelációt mutat a tumor inváziós képességével és a metasztázis képzéssel a legtöbb daganatos megbetegedésben. A STAT3 központi szereplője annak az összetett jelátviteli úthálózatnak, amely közvetíti az EMT folyamatát glioblastoma esetén (Demaria et al., 2014).

Az aktivált STAT3 szabályozza a melanóma sejtek tumor invázióját az *MMP-2* gén átírásán keresztül, valamint fokozza a húgyhólyag tumorsejtek *MMP-1* és *MMP-10* indukált migrációját. A STAT3 a tumorsejtek migrációjához és inváziójához transzkripciós útvonalaktól függetlenül is hozzájárulhat, ugyanis közvetlen kapcsolatban van a sejtmotilitás központi elemeivel, többek között a mikrotubulusokkal és a fokális adhézióval is (Avalle et al., 2012; Xiong et al., 2014)

A STAT3 aktiváció a daganatokban gátolja a gyulladásos citokinek és kemokinek, például a tumor nekrosis faktor α (TNF- α) és az INF- γ expresszióját, melyek aktiválhatnák a tumorelles immunitást. Ezzel szemben elősegíti olyan faktorok kifejeződését, mint a VEGF és IL-10, melyek gátolják a dendritikus sejtek érését és a T-sejtek aktiválódását, ami immuntoleranciát eredményez (Fisher et al., 2014; Kamran et al., 2013).

A STAT3 a ciklin B1, cdk1, c-myc és cyclin D1 proto-onkogének transzkripciójának fokozásával és a p21 tumorsupresszor gátlásával elősegíti a sejtek proliferációját. Fokozza a Bcl-2 fehérje és a Bcl-2 fehérjecsalád egyéb antiapoptotikus tagjainak, így pl. BAK és Bcl-XL expresszióját, ezáltal gátolja az apoptózis intrinszc útvenalát (Epling-Burnette et al., 2001; Kamran et al., 2013). Kimutatták, hogy tirozin foszforiláció hiányában a pSer-STAT3 is képes kötődni a *bcl-2* gén promóteréhez (Choi & Han, 2012). A STAT3 gátolja a tumorsejtek p53 közvetített apoptózist a p53 gén promóterének a csendesítésével.

Emellett az apoptózis extrinszc útvenalát is elnyomja a FAS (CD95) sejthalál receptor transzkripciós repressziójával (Pham et al., 2020). Epitek sejtekben, a STAT3 közvetten is gátolja az apoptózist a Hsp70 dajka fehérje és a C-típusú lektin típusú RegIII β fehérjék szabályozásával, melyek túlzott expresszióját kimutatták a vastagbélrákban és több gyulladásos bélbetegségben (Xu et al., 2018). A STAT3 tirozin foszforilációja elősegíti a G₁/S fázis átmenetet a sejtciklus során a gyomor- és nyelőcső daganatokban (Zhou et al., 2018).

2.2. Kelidonin

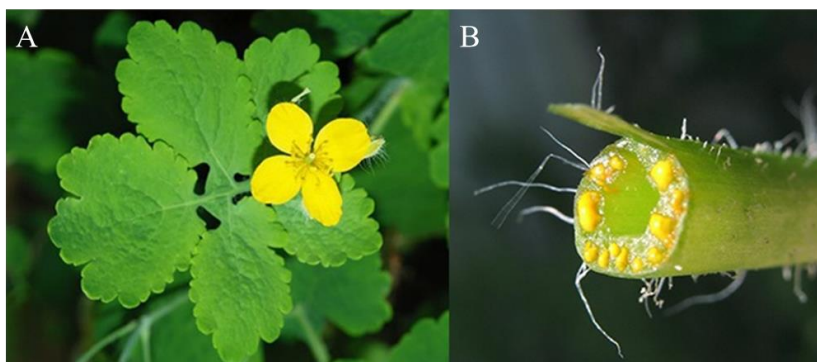
2.2.1. Alkaloidok

Az alkaloidok növényekben található olyan természetesen előforduló, bázikus, főként heterociklikus szerves vegyületek, melyek legalább egy nitrogénatomot tartalmaznak. A növények különböző részeiben szerves savakkal képzett sók formájában dúsulnak fel. Jelentős élettani és fiziológiai hatással rendelkező másodlagos anyagcsere-termékek, így feltehetően a mikroorganizmusok elleni védelmi mechanizmusok egy részét az alkaloidok biztosítják a

növényekben. Egyes alkaloidok részt vehetnek a sejtek növekedésének és osztódásának a szabályozásában a növények bizonyos részeiben, mint például a gyökércsúcsokban. Farmakológiai hatásukat a modern orvostudomány gyorsan felismerte. Napjainkban számos olyan szintetikus vagy fél-szintetikus hatóanyagot tartalmazó gyógyszer van forgalomban, melyeknek az alapjait növényi alkaloidok, vagy azok származékai adják (Bhikha, 2018).

2.2.2. Vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus*)

A vérehulló fecskefű a mákvirágúak rendjébe (*Papaverales*), és ezen belül a mákfélék családjába (*Papaveraceae*) tartozó lágyszárú, évelő növény. Őshonos Európában, Ázsia nyugati és középső részein, valamint Észak-Afrikában. Amerika északi területein is gyakori, de ezeken a területeken nem őshonos, valószínűleg behurcolták. Erdők szélén, parlagokon, kerítések mentén, árokpartokon előforduló, rudeális társulásokban élő közönséges gyomnövény. Gyakran telepedik meg várfalak repedéseiben és meredek, napos sziklafalak keskeny hasadékaiban. A növény jellegzetessége, hogy a sérülések helyein vörössárga, ragadós tejnedv csordul ki (Zielinska et al., 2018) (7. ábra).



7. ábra: Vérehulló fecskefű (A) és az alkaloidokban gazdag növényi tejnedv (B)

<https://nepgyogyaszat.com/cikkek/szemolcsok-eltavolitasa-verehullofecskefuvvel/>

A növény nedveit és a gyökérrészét évszázadok óta használják a népi gyógyászatban. Már az I. században szerkesztett, *De materia medica* gyógynövények gyógyszerkönyvében is említést tesznek arról, hogy a gyökérrész rágcsálása csökkenti a fogfájást. Az európai népi gyógyászat azóta is gyakran használja a növény törött szárának friss nedvét szemölcsök eltávolítására, ekcéma és vágások kezelésére. A lengyel tradicionális gyógyászat szerint a vérehulló fecskefű leveleiből főzött teának pedig féreghajtó hatása van (Zielinska et al., 2018).

Sokoldalú felhasználását a népi gyógyászatban a benne található számos szerves savnak, karotinoidnak, flavinnak és több mint húsz féle izokinolin-alkaloidnak köszönheti. Az izokinolin-alkaloidok szerkezetük alapján három csoportba oszthatók: (I.) protopin és

származékai, (II.) protoberberin (berberin, koptizin), (III.) benzofenantridin-vázas alkaloidok (BA) (kelidonin, szangvinarin és keleritrin). A keldonin, a berberin és a koptizin főként a növény szárának és leveleinek a fő alkaloid komponensei, míg a szangvinarin és a keleritrin a gyökérrészben dúsul fel (Ganan et al., 2016).

2.2.3. Benzofenantridin-vázas alkaloidok

A benzofenantridin-vázas alkaloidok, melyeket főként a *Papaveraceae* és a *Rutaceae* családokba tartozó növények állítják elő, három kategóriába sorolhatók: I. típusú (hexahidrobzenofenantridin), II. típusú (dihidrobzenofenantridin) és III. típusú (kvaterner bzenofenantridin) (Han et al., 2016). A benzofenantridin-váz kialakításának bioszintetikus útját empirikus megfigyelések és hipotetikus következtetések alapján határozták meg. Az egyik elfogadott nézet szerint a benzofenantridin-alkaloidok egy benzil-izokinolin-alkaloidból származnak (Colombo & Bosisio, 1996; Han et al., 2016).

A benzofenantridin-vázas alkaloidok széles spektrumú farmakológiai hatásokkal rendelkeznek. A virális replikációhoz nélkülözhetetlen reverz transzkriptáz enzim gátlásával képesek csökkentik az RNS tumor vírusok aktivitását. Gombaellenes hatásuk többek között a *Microsporum canis*, az *Epidermophyton floccosum* és az *Aspergillus fumigatus* fajok ellen irányul. A szangvinarin és a keleritrin jelentős antibakteriális hatással rendelkezik számos Gram-pozitív (*Staphylococcus Aureus*) és Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) baktériumra nézve. Fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásuk van, valamint apoptózist és nekrozist váltanak ki. Daganatellenes hatásuk hátterében az áll, hogy egyrészt jelentős mértékben gátolják a topoizomeráz I és II valamint a telomeráz aktivitást, másrészt képesek befolyásolni a mikrotubuláris rendszer dinamikus átrendeződését (Colombo & Bosisio, 1996; Han et al., 2016).

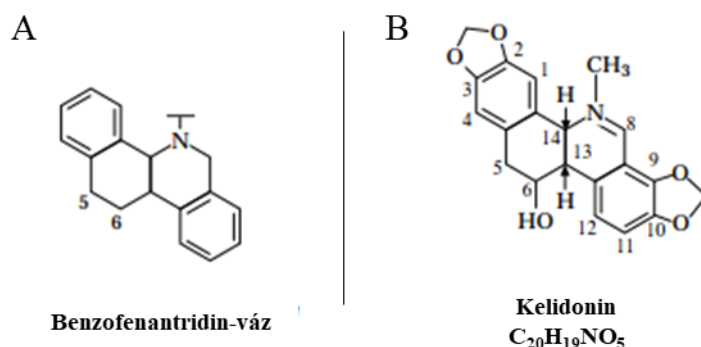
Az humán daganatos sejtvonalakra gyakorolt *in vitro* citotoxikus aktivitásuk miatt az elmúlt években egyre nagyobb figyelem övez több benzofenantridin-vázas alkaloidot is, mint például a szangvinarin, keleritrin és keldonin. Annak ellenére, hogy a természetesen előforduló alkaloidok mindennapi alkalmazásához a daganatellenes terápiákban még számos kihívást kell leküzdeni, farmakológiai hatásmechanizmusok pontos feltérképezése lehetőséget kínálhat új daganatellenes gyógyszerek fejlesztéséhez.

A legfontosabb kihívást a daganatos sejtek alkaloid rezisztenciájának kialakulása, nem megfelelő farmakokinetika, valamint az alkaloid eredetű készítmények alkalmazása során tapasztalható, sokszor súlyos mellékhatások leküzdése jelenti (Zhang & Kanakkanthara, 2020). Különböző megoldások léteznek az ismertett problémák kiküszöbölésére, így pl. specifikus

gyógyszerhordozó anyagok alkalmazása és/vagy más tumorellenes gyógyszerekkel történő kombinált alkalmazásuk.

2.2.4. Kelidonin molekuláris szerkezete és ismert hatásai

A 353,4 g/mól molekulasúlyú kelidonin az I. típusú benzofenantridin-vázas alkaloidok csoportjába tartozik. Az alkaloidokra jellemző nitrogén atomhoz egy metilcsoport kapcsolódik. A kelidonin képlete: $C_{20}H_{19}NO_5$ (8. ábra).



8. ábra: Benzofenantridin váz (A) és kelidonin szerkezete (B) (Colombo & Bosisio, 1996)

Kutatócsoportunk korábban feltárta, hogy a kelidonin gátolja az OCM-1 uveális melanóma sejtek proliferációját, amelynek hátterében az alkaloid apoptózist (és nekrozist) kiváltó hatása áll (Kemeny-Beke et al., 2006). A kelidonin proliferációgátló hatását számos egyéb sejt típuson is leírták, így primer nyálkahártya keratinocitákon, fibroblasztokon, humán cervikális karcinóma, valamint transzformált majom és humán vesesejteken (Havelek et al., 2016; Herrmann et al., 2018; Panzer et al., 2001).

A kelidonin egyik ismert intracelluláris célpontja a mikrotubuláris rendszer: gátolja a tubulin polimerizációt és csökkenti a mikrotubulusok mennyiségét a sejtekben. Feltehetően a kolhicin-kötő helyre épül be, ezáltal beavatkozik a mikrotubulusok dinamikus instabilitásába, aminek következtében a kinetokór mikrotubulusok nem képesek megfelelően kapcsolódni a kromoszómákhoz a sejt ciklus metafázisában. A szabad kinetokór mikrotubulus úgy viselkedik, mint egy enzim, amely katalizálja a mitotikus orsó ellenőrzési pont fehérje 2 (Mad2) konformációs változását. A Mad2 és a sejtosztódási ciklus 20 homológ (Cdc20 vagy p53Cdc) fehérjék kötődnek az anafázis promóveáló komplexhez (APC) és inaktív állapotban tartják azt. Az inaktív APC nem képes ubikvitinálni sem a ciklin-B1-t, sem a szekurin/szeparáz komplex szekurin tagját. Az előbbi eredményeként az M-cdk aktivált állapotban marad, míg az utóbbi

hatására a szeparáz nem képes szétválasztani a testvérkromatidákat, ami a sejtciklus G₂/M fázisban történő berekesztését eredményezi (Panzer et al., 2001; Wang et al., 2016; Wolff & Knippling, 1993).

A kelidonin hatására kialakult G₂/M blokk többek között olyan morfológiai változásokat eredményez, mint a multipoláris magorsó fonalak és többmagvú óriás sejtek kialakulása, melyek a mitotikus katasztrófa meghatározó jellemzői közé tartoznak. A többmagvú óriás sejtek nem életképesek, ezért apoptózis-szerű sejtpusztuláson mennek keresztül (Mc Gee, 2015; Panzer et al., 2001).

Napjainkban, a daganatellenes terápiák egyik legnagyobb kihívása a tumorsejtek apoptózissal szembeni rezisztenciájának a leküzdése. A kelidonin humán gyomorrák és emlő adenokarcinóma sejtekben megkerülte az apoptózissal szembeni ellenállást, mitotikus katasztrófát és következményes sejtpusztulást váltott ki (Qu et al., 2016).

A kelidonin mitokondriumok működését is képes megzavarni: gátolja az oxidatív foszforilációt, fokozza a reaktív oxigénszármazékok (ROS) felhalmozódását, valamint csökkenti a mitokondriális membránpotenciált. Ezek a mitokondriális diszfunkciók beindítják a programozott sejthalál intrinszc útját (Xie et al., 2020).

Molekuláris dokkolást alkalmazva a közelmúltban kiderült, hogy a kelidonin közvetlenül képes kapcsolódni az EGF receptorhoz, így gátolva az EGFR, valamint a MEK és az Erk kinázok foszforilációját. A nem kissejtes tüdőrákra jellemző EGF receptor kettős pontmutációja drog-rezisztenciát eredményez a tirozin kináz gátlókkal szemben. A kelidonin nagyobb affinitással kötődik a dupla-mutáns EGFR-hoz, mint a vad típusúhoz. Ez alapján a kelidonin feltehetően szelektíven gátolja az EGFR foszforilációját a dupla-mutáns receptorral rendelkező sejtekben (Xie et al., 2020).

A kelidonin gyulladáscsökkentő hatása már régóta ismert, de a részletes molekuláris mechanizmust csak az elmúlt pár évben sikerült feltárni. A kelidonin gátolja a TNF-indukált NF- κ B aktivációt azáltal, hogy megakadályozza az NF- κ B inhibitor α (I κ B α) foszforilációját és következményes degradációját, valamint a p65 fehérje nukleáris transzlokációját (Zhang et al., 2018).

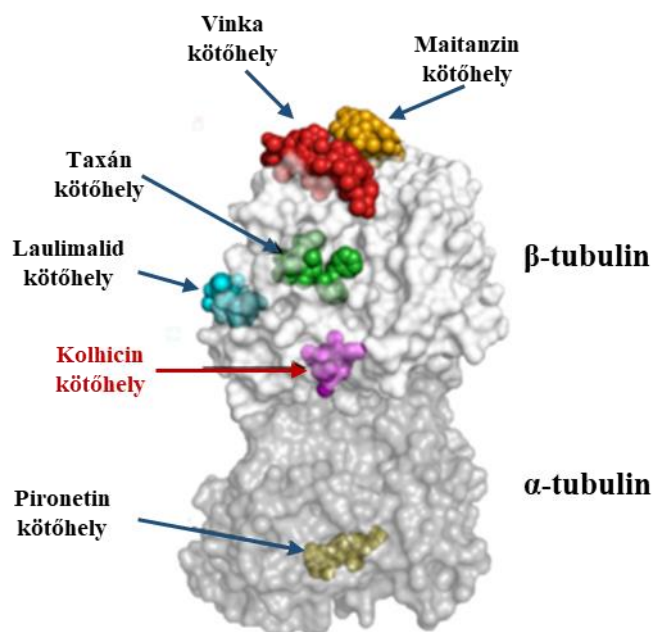
2.3. Mikrotubulus-célzó szerek

A mikrotubulusok az egyike annak a három fehérje filamentum családnak, melyek részt vesznek a citoskeleton felépítésében és biztosítják annak változatos funkcióit az eukarióta

sejtekben. A mikrotubulusok tubuláris szerkezete az $\alpha\beta$ -tubulin heterodimerekből felépülő protofilamentumok laterális asszociációjából alakul ki. Ezek a hosszú és viszonylag merev üreges struktúrák rendkívül dinamikusak, a folyamatosan változó sejtigényekre reagálva az egyik végükön gyorsan széteshetnek (depolymerizáció), a másikon pedig újra összeállhatnak (polimerizáció) (Kaul et al., 2019).

A mikrotubulusok kritikus fontosságúak a vezikulák, a fehérjék és az organellek intracelluláris transzportjában, a sejtek migrációjában és alakjának a megőrzésében, valamint a mitózisban is. Nélkülözhetetlen szerepet játszanak az orsó összeszerelési ellenőrző pontban (SAC), ahol a metafázisos kromoszómák megfelelő elrendeződésének és elválasztásának ellenőrzése történik (Zhang & Kanakanthara, 2020).

Napjainkra több tucat mikrotubulus-célzó szert izoláltak tengeri és szárazföldi élőlényekből, ideértve a magasabb rendű növényeket, a tengeri szivacsokat, a cianobaktériumokat és az endofita baktériumokat. Ezek a másodlagos anyagcsere termékek eltérő kémiai szerkezetük ellenére, képesek közvetlenül kötődni a tubulinhoz ezáltal megzavarni a mikrotubulusok szerkezetét és dinamikáját. Az MTA-k nagy száma és szerkezeti sokfélesége ellenére viszonylag kevés MTA kötőhelyet fedeztek fel a mikrotubulusokon (9. ábra). A hat ismert MTA kötőhely közül öt a β -tubulinon helyezkedik el, amelynek oka feltehetően az, hogy a mikrotubulus dinamikus instabilitásához nélkülözhetetlen GTP hidrolízis ezen az alegységen zajlik. Meglepő módon eddig még nem sikerült azonosítani olyan MTA-t, mely a β -tubulin nukleotid kötőhelyéhez kapcsolódna (Steinmetz & Prota, 2018; Zhang & Kanakanthara, 2020).



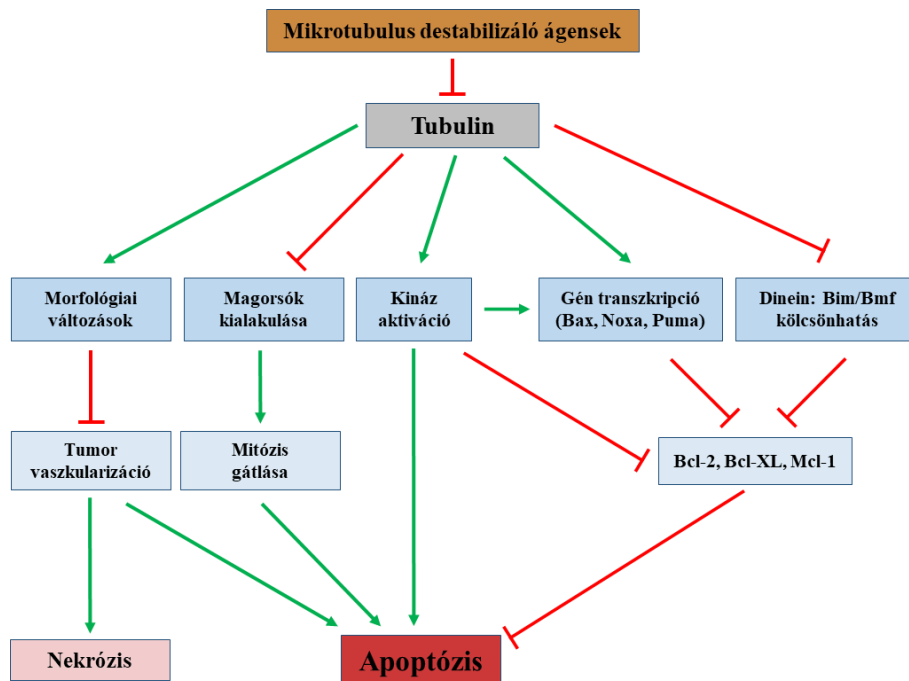
9. ábra: A mikrotubulus-célzó szerek ismert kötőhelyei

A tubulin dimeren belül hat MTA kötőhely különíthető el, melyek a pironetin kötőhelyet leszámítva a β -tubulinon helyezkednek el. A kelidonin feltehetően a kolhicin kötőhelyre épül be (Zhang & Kanakkanthara, 2020).

Az MTA-kat két osztályba sorolják: a mikrotubulus-stabilizátorok elősegítik a tubulin polimerizációját, míg a mikrotubulus-destabilizátorok a tubulin szálak depolimerizációját idézik elő. Az első osztályba tartozik a kolhicin, kriptoficin, esztramusztin és a legtöbb vinka alkaloid, míg a másodikba a docetaxel, epotilonok és az elsőként felfedezett MTA, a paklitaxel (Kaul et al., 2019).

Viszonylag magas koncentrációban mindkét osztályba tartozó MTA-k képesek jelentős mértékben módosítani a tubulin polimerek mennyiségét, ezáltal leállítani a sejtciklust. A rendellenes magorsó fonalak kialakulása SAC ellenőrző pont aktiválásával idézi elő a sejtciklus leállítását a G_2/M fázisban, ami végső soron apoptózis révén kiválthatja a sejthalált. Alacsony koncentrációban az MTA-k a multipoláris magorsó fonalak kialakításával mitotikus csúszást okozhatnak, ami a sejtciklus berekesztését eredményezheti a G_1 fázisban. A G_1 fázisban rekedt aneuploid sejtekben végül beindul az apoptózis folyamata. A sejtek belépése a mitózisba alapvető előfeltétele a MTA-kal történő sejtölésnek, de az apoptózist nem feltétlenül a G_2/M blokk indítja be (10. ábra) (Mukhtar et al., 2014).

Több MTA-ról, így pl. a nokodazolról és a paklitaxelről, bebizonyosodott, hogy beavatkozik a STAT3 szerin foszforilációjába és IL-6 kiváltott aktivációjába (Shi et al., 2006; Walker et al., 2011; Walker et al., 2010).



10. ábra: Az MTA-k által kiváltott apoptózishoz vezető események összefoglalása

A mikrotubulus destabilizáló ágensek a mikrotubuláris rendszer károsításán keresztül olyan események sorozatát indítják el, melyek végsősoron a sejtek apoptózisához vezetnek. Ezek közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak a kóros magorsó fonalak kialakulását és az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjecsald kifejeződésének gátlását eredményező folyamatok (Bates & Eastman, 2017).

Bax: Bcl-asszociált X fehérje; **Noxa:** forbol-12-mirisztát-13-acetát indukált fehérje 1; **Puma:** p53-szabályozott apoptózis modulátor; **Bim:** Bcl-2 kölcsönható sejthalál mediátor; **Bmf:** Bcl-2 módosító faktor; **Mcl-1:** mieloid sejtes leukémia 1

Az MTA-k hatékonyságát és klinikai alkalmazását több folyamat is hátrányosan befolyásolja. Egyrészt a legtöbb daganatos sejtípuson fokozottan kifejeződő Pgp (P-glikoprotein) és MRP (multidrog rezisztencia fehérje) membránfehérjék képesek kipumpálni az MTA-kat is. Másrészt a mikrotubulusokat legalább 13 izotípusú α és β tubulin építi fel, melyekhez az MTA-k különböző hatásokkal képesek kötődni. Az MTA-mikrotubulus kapcsolódást jelentős mértékben befolyásolja a mikrotubulusok poszttranszlációs módosítása is. A rezisztencia mechanizmusok mellett az MTA-k klinikai alkalmazásának másik fő korlátja a gyakori és súlyos mellékhatások, így pl. axonális neuropátia, kialakulása, melyekre nincs hatékony kezelés (Dumontet & Jordan, 2010).

Az MTA-k klinikai sikerének eredményeként folyamatosan kutatják és azonosítják az új mikrotubulusokra ható szereket. Az elmúlt 50 évben számos olyan MTA-t fedeztek fel és izoláltak, melyek klinikai alkalmazásba kerültek a daganatellenes terápiákban. Azonban még mindig több tisztázatlan kérdés van a hatásmechanizmusukkal kapcsolatban, mint például a gyakori rezisztencia és az effektív dózis telítődésének kialakulása. Így az eddig megismert

növényi eredetű MTA-k biológiai és biokémiai jellemzőinek pontosabb megértése elősegíti az új és hatékonyabb szerek kifejlesztését.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a benzofenantridin-vázis alkaloidok családjába tartozó kelidonin apoptózist és nekrozist vált ki az OCM-1 humán, uveális melanóma eredetű sejteken. Irodalmi adatok alapján a kelidonin – a daganatterápiában széles körben alkalmazott mikrotubulus-célzó szerekhez hasonlóan – megzavarja a mikrotubulusok polimerizációs/depolymerizációs dinamikáját, a sejtciklust pedig a G₂/M fázisban berekeszti. Emellett több MTA esetén kimutatták, hogy beavatkozik a STAT3 transzkripció faktor tirozin és szerin foszforilációs folyamataiba.

A fentieket figyelembe véve kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- milyen hatással van a kelidonin az OCM-1 és OCM-3 uveális melanóma sejtek sejtciklusára;
- változik-e kelidonin hatására az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal tagjainak, illetve a STAT3 által szabályozott antiapoptotikus Bcl-2 fehérjének az expressziója;
- hogyan befolyásolja a kelidonin a STAT3 tirozin és szerin foszforilációját, illetve a kétfajta foszforilációra gyakorolt hatás között kimutatható-e korreláció.

Az apoptotikus sejtek és a sejtciklus egyes fázisaiban lévő sejtek frakcióját DNS-fragmentációs eljárással, míg halott sejtek arányát Annexin V – PI kombinált kötődésével áramlási citometriával határoztuk meg. A STAT3 tirozin- és szerin foszforilációjának a mértékét, illetve az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal tagjainak és a Bcl-2 fehérjének az expresszióját immunfluoreszcens jelzést követően áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk meg. Ezek a megközelítések lehetővé tették a sejtenkénti kiértékelést, így feltárhatók voltak a sejtpopuláción belüli lehetséges heterogenitások és korrelációk.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált oldatok

PBS puffer	150 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 5,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ ; pH=7,4
Hipotóniás propídium jodid (PI) oldat	50 µg/ml PI (P4170, Sigma Aldrich), 0,1% Triton X-100, 0,1% nátrium-citrát
Annexin V-kötő puffer	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ ; pH=7,5
Jelölő puffer	1×PBS, 2% FBS, 0,1 % Na-azid
0,01 M PBS	8,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,6 mM NaH ₂ PO ₄ , 145 mM NaCl, 15 mM Na-azid, 1% BSA; pH=7,5

4.2. OCM sejtvonalak jellemzése

Kísérleteink során az OCM-1 és OCM-3 (okuláris choroidális melanóma-1 és 3) humán primer uveális melanóma sejtvonalatokat használtuk, amelyeket H. Monique H. Hurks (Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden, Hollandia) bocsátott a kutatócsoport rendelkezésére. Mindkét sejtvonalt malignus daganatokra jellemző növekedési tulajdonságokat mutat, egyrészt az egyrétegű tenyészetek sejtjei nagyfokú rendezetlenségben nőnek minden irányban, másrészt még magas sejtkoncentrációban sem figyelhető meg a kontaktgátlás jelensége. A humán melanómákban gyakori GNAQ és GNA11 mutáció egyik sejtvonaltban sem figyelhető meg, ugyanakkor a BRAF (V600E) mutáció mindkettőben kimutatható. Mindkét sejtvonalt tartalmazza a következő melanóma markereket: Melan-AMART-1, gp100, tirozináz, tirozináz-függő protein-1 és dopakróim-tautomeráz (Folberg et al., 2008; Griewank et al., 2012). Az orsósejtes morfológiájú OCM-1 és az epitelioid sejt morfológiájú OCM-3 sejtvonaltak egyaránt rosszindulatú humán uveális melanómákból származnak. Az OCM-3 sejtekhez viszonyítva az OCM-1 sejtek alacsonyabb proliferációs rátával rendelkeznek (Kaliki et al., 2015; Van Ginkel et al., 1998).

4.3. Sejttenyésztés és kezelés

A sejteket 10% főtális borjú szérumot (FBS, F9665, Sigma-Aldrich) tartalmazó RPMI 1640 sejttenyésztő tápfolyadékban (R6504, Sigma-Aldrich), állandó parciális nyomású CO₂ atmoszféra (5% CO₂) és páratartalom mellett, 37 °C-on tenyésztettük. A tápfolyadék 2 mM L-glutamint (G3126, Sigma-Aldrich) és az esetleges fertőzések elkerülése végett 50 µg/ml penicillint (P4333, Sigma-Aldrich) tartalmazott.

A sejteket hetente három alkalommal passzáltuk, mely során először eltávolítottuk a sejttenyésztő folyadékot, majd a tenyésztő edény aljához letapadva növekedő sejtekhez 3 ml 1%-os tripszin oldatot mértünk. A letapadt sejtek 3-5 perces, 37 °C-on történő inkubáció után felváltak az aljatról. A tripszin hatását néhány ml 37 °C-os tápfolyadék hozzáadásával közömbösítettük, majd a sejtszuszpenziót centrifugáltuk (5 perc, 200×g, 37°C). A felülúszó eltávolítása után a sejtekhez mértük a megfelelő mennyiségű friss tápfolyadékot, majd az így nyert sejtszuszpenziót flaskában vagy – az alkaloiddal végzett kísérletek során – 6-lyukú sejttenyésztő edényben tenyésztettük tovább (ld. 4.3.1. fejezet). A tenyésztéshez szükséges sejtszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg.

4.3.1. Kelidonin kezelés

A frissen passzált, az előzőekben leírt módon előkészített sejtekből 2-2 ml-t mértünk 6-lyukú sejttenyésztő edény lyukaiba (500000 sejt/ml), majd 24 órán keresztül növesztettük őket. Ez idő alatt a sejtek a tenyésztőedény felszínének 80-90%-át fedő konfluens réteget képeztek.

Az alkaloid kezelés során az adott kísérlethez szükséges koncentrációban (1 vagy 4 µg/ml) kelidonint (54274, Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez, majd további 24 órán keresztül tenyésztettük őket. Az időfüggéses kísérletek esetében a 24 órás kezelés mellett két rövidebb (6 és 12 óra) időtartamot is alkalmaztunk. A kelidonin törzsoldatot a kezelések előtt, frissen hígítottuk dimetil-szulfoxidban (DMSO, D2650, Sigma-Aldrich). Több koncentráció alkalmazása esetén hígítási sorozatot alkalmaztunk, így minden esetben azonos térfogatú alkaloid oldatot adtunk az egyes mintákhoz. A kontroll minták esetén ugyanilyen térfogatú tiszta DMSO-t mértünk be. Az előzőek alapján a DMSO koncentráció minden mintában 0,5 v/v % volt.

A kelidonin kezelés során a sejtek egy jelentős része felvált az edény aljzatáról. Annak érdekében, hogy ezeket a sejteket ne veszítsük el, a kezelés végén a felülúszót előre feliratozott 15ml-es centrifuga csövekbe gyűjtöttük össze. Az aljzathoz letapadva maradt sejteket a 4.3.

fejezetben leírt módon, tripszinezésnek vetettük alá, annyi különbséggel, hogy itt 2%-os tripszinoldatot alkalmaztunk (2 ml/lyuk). A magasabb koncentráció alkalmazásának oka, hogy maximalizáljuk a sejtek kinyerésének hatékonyságát. A tripszinezést követően felvált sejteket a megfelelő (ugyanazon minta felülúszóját tartalmazó) centrifugacsövekbe pipettáztuk. Ezt követően a sejteket 5-5 ml PBS pufferben mostuk (5 perc, 200×g, 37°C), majd a felülúszó eltávolítása után a sejteket az aktuális kísérletnek megfelelő pufferrel és koncentrációban szuszpenzióba vittük.

4.3.2. IL-6 kezelés

A sejteket a 4.3. fejezetben említett módon mostuk, friss RPMI médiumban szuszpendáltuk (10^6 sejt/ml), majd 20ng/ml koncentrációjú IL-6 (206-IL-010, R&D Systems) jelenlétében, 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk. A kísérleteinkben alkalmazott IL-6 koncentrációt a STAT3 aktiváció mértékének idő- és koncentráció-függő vizsgálata alapján határoztuk meg (5.1.1. fejezet).

4.4. Áramlási citometria

A sejtek életképességét, a sejtciklust, a fehérjék expresszióját és a STAT3 foszforilációját fluoreszcens reagensekkel történő jelzést követően áramlási citometriával vizsgáltuk. A technika segítségével rövid időn belül, nagyszámú sejtről nyerhető egyedi sejtszintű információ, valamint különböző celluláris paraméterek korrelált vizsgálatát is lehetővé teszi (McKinnon, 2018). A jelölések részletes protokollját, amely szerves egészet alkot az alkalmazott mérési és kiértékelési stratégiával, az adott vizsgálati módszernél ismertetem.

Az áramlási citometriás mérések során zöld (532 nm) és vörös (635 nm) dióda lézerekkel felszerelt FACSCArray áramlási citométert (Becton Dickinson Company) alkalmaztunk. A mérések során a fluoreszcencia jel(ek) mellett az előre és oldalra irányuló fényszórás (FSc és SSc) jeleket is rögzítettük (az 532 nm-es megvilágítás felhasználásával). A mérések során kezelésként három párhuzamosan, azonos feltételek mellett jelölt mintát vizsgáltunk. Az egyes vizsgálatok során felhasznált fluorofórok gerjesztési és detektálási paramétereit az III. táblázat foglalja össze.

III. táblázat: Áramlási citometriás méréseinkhez használt fluorofórok gerjesztési és detektálási hullámhossza

Fluorofór neve	Csatorna neve	Gerjesztés hullámhossza	Detektálás hullámhossza
<i>PI</i>	„Yellow” (sárga)	532 nm	585±21nm
<i>PE</i>			
<i>Alexa Fluor 546</i>			
<i>Alexa Fluor 647</i>	„Red” (piros)	632 nm	661±8nm

(PE: *Phycoerythrin*)

Az áramlási citometriás adatokat az FCS Express 6 (De Novo Software) és FlowJo (BD Biosciences) szoftverekkel értékeltük ki. Első lépésként a kétféle fényszórást (Fsc és Ssc) korrelált módon megjelenítő kétparaméteres diagrammokon (dot-plot) alkalmazott kapu segítségével a sejttörmeléket kizártuk a további analízisből. Az analízis további lépéseit az adott vizsgálati módszer határozza meg, így arra a releváns fejezetben térek ki.

4.5. Konfokális mikroszkópiás vizsgálatok

A tirozin és szerin foszforilált STAT3 sejten belüli lokalizációját, ugyancsak fluoreszcens jelölést követően, konfokális mikroszkópiával tanulmányoztuk. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok során kis átmérőjű apertúra alkalmazásával kizárjuk a fókuszsíkon kívülről érkező fénysugarakat, ezáltal az adott sejtparaméter a sejt egy jól meghatározott, vékony rétegében vizsgálható (Jonkman et al., 2020).

Konfokális mikroszkópiás méréseinket Olympus Fluo View 1000 (Olympus Corporation) vagy Zeiss LSM 880 (Zeiss) konfokális mikroszkópokkal végeztük el. A mikroszkópos vizsgálatokhoz ugyanazokat vagy ugyanolyan körülmények között előkészített mintákat használtunk, mint az áramlási citometriás mérésekhez. A megfelelő módon jelölt és formaldehiddel fixált sejtszuspenziót tisztított tárgylemezre cseppentettünk, majd 5-5 µl Mowiol (81381, Sigma-Aldrich) hozzáadása után fedőlemezzel lefedtük. A Mowiol segíti a sejtek kitapadását a tárgylemezhez, valamint csökkenti a fluorofórok kiégését. A felhasznált fluorofórok gerjesztési és detektálási paramétereit az IV. táblázat foglalja össze.

IV. táblázat: Konfokális mikroszkópiás méréseinkhez használt fluorofórok gerjesztési és detektálási hullámhossza

Fluorofór neve	Gerjesztés (lézer, hullámhossza)		Detektálás hullámhossza	Mikroszkóp
<i>Alexa Fluor 647</i>	He-Ne	633 nm	651-755 nm	Olympus 1000
				Zeiss LSM 880
<i>DAPI</i>	dióda	405 nm	410-474 nm	Zeiss LSM 880
<i>FITC</i>	Argon ion	488 nm	499-533 nm	Olympus 1000
				Zeiss LSM 880
<i>PI</i>	He-Ne	543 nm	562-615 nm	Olympus 1000
<i>PE</i>	He-Ne	543 nm	562-615 nm	Olympus 1000
				Zeiss LSM 880

(**DAPI**: 4',6-diamidino-2-fenilindol, **FITC**: fluoreszcein-izotiocianát)

Annak érdekében, hogy elkerüljük az egyes csatornák közötti esetleges átvilágítást, a képeket ún. „szekvenciális üzemmódban” vettük fel, mely során a különböző festékek gerjesztése és detektálása nem egyidőben, hanem egymás után történik. A sejtekről 512x512 vagy 2048x2048 pixel méretű (pixel méret: ~88 nm) képeket vettünk fel 60x UPSAPO immerziós olajos objektívvel (NA 1,35). A képek analízisét a mikroszkópok saját szoftvereivel vagy a FIJI képanalizáló programmal végeztük el.

4.6. Sejthalál vizsgálatok

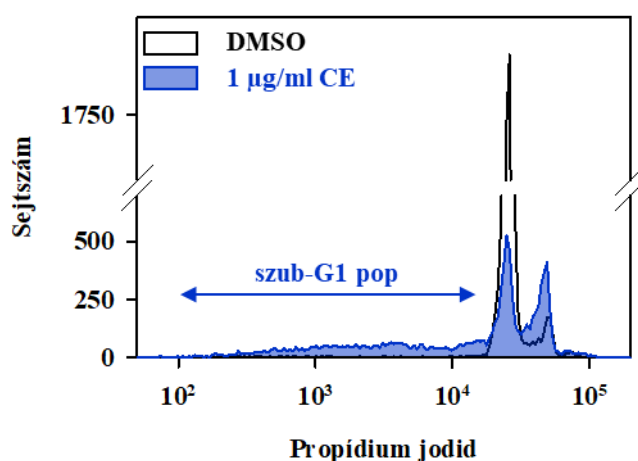
4.6.1. DNS fragmentáció vizsgálata

Az apoptózis egyik fő morfológiai jellemzője a magi DNS szétesése néhány száz bázispár nagyságú fragmentumokra. A széttöredezett DNS-t megfelelő detergenssek segítségével el lehet távolítani a sejtekből. Áramlási citometria segítségével a DNS tartalom sejtenkénti eloszlását mutató hisztogramon az alacsonyabb DNS tartalom alapján az apoptotikus sejtek elkülöníthetők a többi sejttől, ideértve az élő, valamint azon nekrotikus sejteket, ahol a sejthalált nem kísérte DNS fragmentáció (Nicoletti et al., 1991; Riccardi & Nicoletti, 2006).

Vizsgálatainkban a korábban említett módon (4.3.1. fejezet) előkészített kelidonin kezelt és kezeletlen sejteket 500µl hipotóniás PI oldatban szuszpendáltuk (~0,5×10⁶ sejt/0,5ml). A mintákat ~20 órán keresztül fénytől elzárva 4 °C-on tartottuk, mely idő alatt a DNS

fragmentumok kimosódtak a sejtekből, valamint a PI interkalálódott a magban maradt DNS bázispárjai közé. A kötődés eredményeként a PI fluoreszcencia kvantumhatásfoka megnő (~20×), így áramlási citométerrel könnyen mérhetővé válik. A mért fluoreszcencia intenzitás a beépült PI mennyiségével, ennek megfelelően a sejtek DNS tartalmával arányos.

A DNS fragmentáció vizsgálatát FACSArray áramlási citométeren végeztük el. Az adatok kiértékelése az FCS Express szoftver (De Novo Software) segítségével történt. Első lépésként az FSC-SSC kétparaméteres dot-plot segítségével kikapuztuk a sejtörmeléket. A PI intenzitás hisztogramon az apoptotikus sejtek csökkent DNS tartalma egy jellegzetes szub-G1 csúcs megjelenését eredményezi, mely alapján azonosíthatók és arányuk meghatározható (11. ábra).



11. ábra: DNS fragmentáció áramlási citometriás vizsgálata

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok OCM-1 sejtek DNS tartalmának eloszlását szemléltetik kelidonin (kék), illetve DMSO (fekete) jelenlétében tenyésztett sejteken. A sejtek DNS tartalma az interkalálódott PI fluoreszcenciájával arányos. A fragmentált DNS-t tartalmazó, ún. szub-G₁ sejtpopulációt, a berajzolt kapu mutatja. A sejteket 24 órán át kelidonin (1 µg/ml) vagy DMSO jelenlétében inkubáltuk, majd a szükséges előkészítő lépéseket követően ~20 órán keresztül 4 °C-on, hipotóniás PI oldatban tartottuk.

(CE: kelidonin, PI: propidium-jodid)

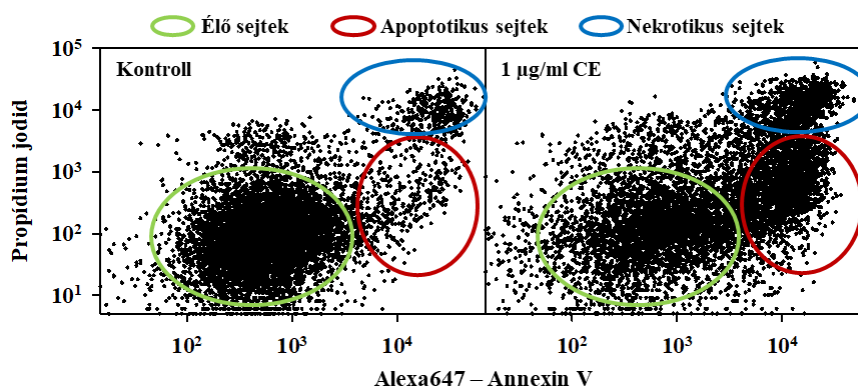
4.6.2. Apoptózis vizsgálat Annexin V és propidium jodid kombinált alkalmazásával

Az apoptózist jellegzetes morfológiai és biokémiai változások különböztetik meg a nekrozistól, ideértve a magi kromatin fragmentációt, a citoplazma zsugorodását és a plazmamembrán aszimmetriájának az elvesztését. Normál, életképes sejtekben a foszfatidil-szerin (PS) a sejtmembrán citoplazmatikus felületén helyezkedik el, míg apoptotikus sejtekben a flippáz enzim működése zavart szenved, így a PS kijut a sejtmembrán külső

rétegébe. Az Annexin V egy 35-36 kDa nagyságú, Ca^{2+} -függő foszfolipid-kötő fehérje, mely nagy affinitással képes kapcsolódni a PS-hez (Nagata et al., 2016).

24 órás kelidonin kezelést követően az 4.3.1. fejezetben leírtaknak megfelelően előkészített sejteket 100-100 μl ún. Annexin-kötő pufferben szuszpendáltuk (10^6 sejt/100 μl). A mintákhoz 5-5 μl Alexa Fluor 647-tel konjugált Annexin V-t (640912, BD Biolegend), valamint 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PI-t adtunk és 15 percig szobahőmérsékleten, fénytől védve tartottuk. Az áramlási citometriás méréseket a jelölést követően azonnal elvégeztük.

Az élő, apoptotikus valamint nekrotikus sejtpopulációkat az Alexa Fluor 647-Annexin V és PI pozitivitásuk alapján különítettük el (Bacso & Eliason, 2001; Bacso et al., 2000), amelyhez az áramlási citometriás adatokat kétparaméteres (dot-plot) formában jelenítettük meg. Az életképes sejtek ép plazmamembránján keresztül egyik reagens sem képes átjutni, így ezek mind az Alexa Fluor 647-Annexin V, mind pedig a PI csatornában alacsony intenzitással jellemezhetők. Az apoptotikus sejtek plazmamembránja impermeábilis PI-ra, viszont a külső membránban feldúsuló PS-hez az Annexin V képes kötődni, ezért ezek a sejtek alacsony PI és magas Alexa Fluor 647 intenzitással rendelkeznek. Nekrózis során a plazmamembrán permeabilitása jelentős mértékben megnő, így a nekrotikus sejtekre mindkét csatornában magas fluoreszcencia intenzitás jellemző (12. ábra).



12. ábra: Apoptózis vizsgálata Annexin V és PI kombinált alkalmazásával

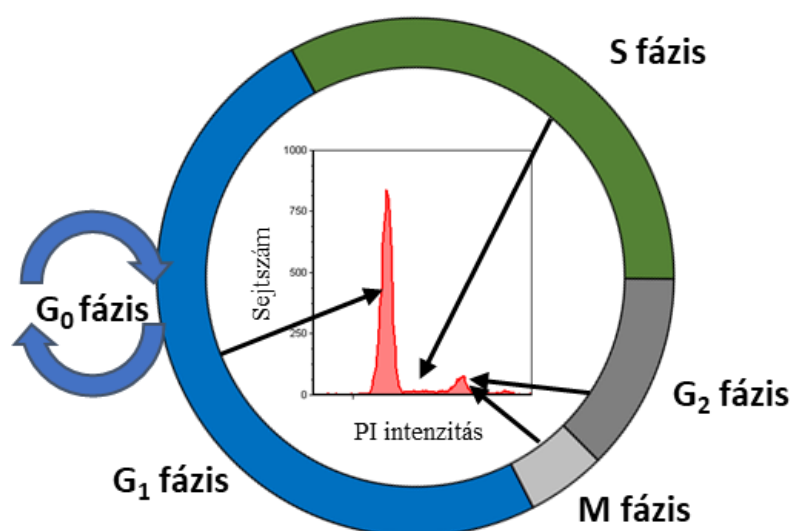
A reprezentatív áramlási citometriás dot-plotok az élő (zöld kapu), az apoptotikus (piros kapu), valamint a nekrotikus sejtpopulációkat szemléltetik kontroll, illetve kelidonin kezelt OCM-3 sejteken. Az egyes alpopulációkat Alexa Fluor 647-konjugált Annexin V és PI kötődésük alapján különítettük el. A sejteket előzetesen 1 $\mu\text{g/ml}$ kelidonin, illetve DMSO (kontroll) jelenlétében tenyésztettük 24 órán keresztül, majd a szükséges előkészítő lépéseket követően Alexa Fluor 647-Annexin V és PI keverékével megfestettük. A mindkét detektálási csatornában alacsony intenzitással jellemezhető (ún. dupla negatív) populáció az élő sejteket, a csak Alexa Fluor 647-Annexin V pozitív alpopuláció az apoptotikus sejteket, míg a mindkét csatornában magas jelet mutató populáció (dupla pozitív sejtek) a nekrotikus sejteket reprezentálja (saját készítésű ábra).

(CE: kelidonin, PI: propidium-jodid)

4.7. Sejtciklus vizsgálatok

A sejtciklus egyes fázisai a sejtek DNS tartalma alapján áramlási citometriás analízis segítségével megkülönböztethetők (Darzynkiewicz et al., 2010; Kim, 2015). A sejtek DNS tartalma az egyik leggyakrabban vizsgált sejtparaméter, mely nem csak arról nyújt információt, hogy egy adott sejt mely szakaszában tart a sejtciklusnak, hanem feltárja a sejtek ploiditását, valamint lehetővé teszi az apoptotikus sejtek hányadának a meghatározását is, ahogy azt az előző részben ismertettem.

Az áramlási citometriával meghatározott DNS-tartalmat DNS-indexként (DI) szokás definiálni. A normál, nem tumoros, euploid sejteket a G_0/G_1 fázisában $DI = 1,0$, G_2/M fázisban $DI = 2,0$, míg az S-fázisú normál sejteket pedig $1,0 < DI < 2,0$ jellemzi (Darzynkiewicz et al., 2010). A DNS-mennyiség változását a sejtciklus során az 13. ábra szemlélteti.



13. ábra: A sejtciklus fázisainak az azonosítása DNS-tartalom alapján

A külső kördiagram a sejtciklus fázisait, a reprezentatív áramlási citometriás hisztogram pedig a DNS-tartalom (PI intenzitás) eloszlását szemlélteti az egyes fázisokban. Az első csúcs a G_0/G_1 fázisnak, míg a második a G_2/M fázisnak felel meg. Az aktív DNS-szintézis során az S-fázisban lévő sejtek DNS-tartalma a G_0/G_1 és G_2/M sejtek DNS-tartalma között változik (saját készítésű ábra).

A DNS eloszlás hisztogram első csúcsa a G_0/G_1 , míg a második csúcs a G_2/M fázisban található sejteket reprezentálja. A hisztogram két csúcsa közötti rész az S fázisban lévő sejtekre jellemző, köztes DNS tartalomnak felel meg. A G_0/G_1 és G_2/M fázisokon belüli további elkülönítésre ez a módszer nem alkalmas.

A sejtciklus vizsgálatainkhoz az 4.3.1. fejezetben leírtak alapján a kelidonin kezelt és kontroll sejteket összegyűjtöttük, majd hipotóniás PI oldatban szuszpendáltuk ($\sim 0,5 \times 10^6$ sejt/0,5ml) és 20 órán át, fénytől elzárva, 4 °C-on tartottuk.

A kiértékelés során az FCS Express 6 kiértékelő programban az FSc/SSc dot-plot ábrákon kikapuztuk a sejttermelést, majd a programba épített „multicycle” modul segítségével meghatároztuk a G₀/G₁, az S és a G₂/M fázisban lévő sejtek arányát.

4.8. Fehérje expresszió és STAT3 foszforiláció vizsgálata

4.8.1. Membránfehérjék immunfluoreszcens jelölése

A membránfehérjék jelölése során az 4.3. fejezetben ismertetett módon előkészített sejteket 4 °C-os PBS-ben szuszpendáltuk, majd hozzámértük a monoklonális antitestet tartalmazó oldatot, amelynek térfogatát telítési sor felvételével határoztuk meg (V. táblázat). A jelölő végtérfogat 50 µl, míg a sejtszám $\sim 0,5 \times 10^6$ volt. A mintákat 45 percig jégen, sötét helyen inkubáltuk, majd a nem kötődött antitestet hideg PBS-ben történő mosással távolítottuk el (5 perc, 200×g, 37°C). A sejteket végül 2% formaldehidet tartalmazó PBS pufferben fixáltuk (500 µl/minta), majd a mérésig fénytől elzárva, 4°C-on tartottuk. Az áramlási citométeres és/vagy konfokális mikroszkópiás vizsgálatokat minden esetben elvégeztük a jelöléstől számított 24 órán belül. Az antitestek aspecifikus kötődését azonos izotípusú, irreleváns antitesttel ellenőriztük.

V. táblázat: Membránfehérjék jelzésére használt monoklonális antitestek

Epitóp	Kapcsolt fluorofór	Izotípus	Gyártó
<i>gp130</i>	PE	egér IgG _{2a}	BD BioLegend
<i>IL6-Rα</i>	Alexa Fluor 647	egér IgG ₁	BD BioLegend
	PE		

4.8.2. Intracelluláris sejtalkotók immunfluoreszcens jelölése

Az intracelluláris jelölés során a korábban T limfóma sejteken a STAT1 aktiváció vizsgálatára alkalmazott protokollunkat optimalizáltuk letapadó sejtekre (*értekezést megalapozó II. publikáció*). Az 4.3. fejezetben ismertetett módon előkészített sejteket 2% formaldehidet tartalmazó PBS pufferben fixáltuk ($\sim 1,5 \times 10^6$ sejt/2ml/minta, 30 perc, 37 °C), majd a jelölő pufferrel mostuk. Ezután a sejteket 90%-os metanolban permeabilizáltuk

($\sim 1,5 \times 10^6$ sejt/2ml/minta, 20 perc, -20°C), majd jelölő pufferben kétszer mostuk. A felülúszó eltávolítása után a sejteket az előre meghatározott mennyiségű jelölő pufferben szuszpendáltuk, centrifuga csövekbe mértük, majd hozzáadtuk a monoklonális antitestet vagy antitesteket tartalmazó oldatot, amelyet telítési sor felvételével határoztuk meg (VI. táblázat). A jelölő végtérfogat 50 μl , míg a sejtszám $\sim 0,5 \times 10^6$ volt. A mintákat 45 percig szobahőmérsékleten, sötétben tartottuk. Ezt követően a sejteket mostuk, végül 2% formaldehidet tartalmazó PBS pufferben szuszpendáltuk. A sejteket a mérésig fénytől elzárva, 4°C -on tartottuk. A minták áramlási citometriás és/vagy konfokális mikroszkópiás vizsgálatát minden esetben 24 órán belül elvégeztük. Az antitestek aspecifikus kötődését azonos izotípusú, irreleváns antitesttel ellenőriztük.

Azon kísérletek során, ahol a STAT3 tirozin foszforilációját is vizsgáltuk, a sejteket jelölés előtt IL-6 stimulációnak vetettük alá (ld. 4.3.2. fejezet). Az alap (konstitutív) tirozin foszforiláció meghatározásához a sejteket azonos körülmények között, de IL-6-mentes médiumban inkubáltuk.

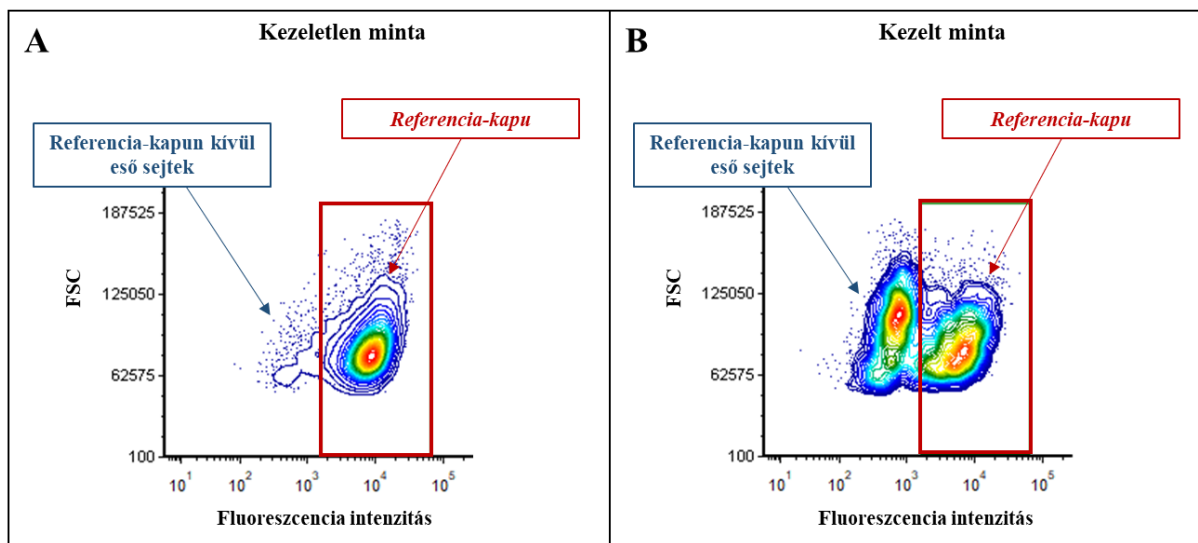
VI. táblázat: Intracelluláris fehérjék jelzésére használt monoklonális antitestek

Epitóp	Fluorofór	Antitest izotípusa	Gyártó
<i>Bcl-2</i>	PE	egér IgG ₁	BD BioLegend
<i>Jak2</i>	PE	egér IgG	Cell Signaling Technology
<i>STAT3</i>	PE	egér IgG _{2β}	R&B SYSTEMS
<i>pTyr-STAT3</i>	Alexa Fluor 647	egér IgG _{2a}	BD Phosflow TM
<i>pSer-STAT3</i>	PE	egér IgG ₁	BD Phosflow TM

4.8.3. Áramlási citometriás fehérje expresszió és STAT3 foszforilációs vizsgálatok kiértékelése

Az áramlási citometriás adatanalízis kritikus lépése egy adott kezelésre (alkaloid, IL-6) válaszoló sejtek megfelelő elkülönítése. Ehhez a megfelelő kontroll (adott ágenssel kezeletlen) minta segítségével létrehoztunk egy olyan ún. „referenciakaput”, amely a kezeletlen minta sejtjeinek túlnyomó többségét tartalmazta. A referenciakapu létrehozásához duplán jelzett sejtek esetén a két fluoreszcencia intenzitást megjelenítő kétparaméteres dot-plot (vagy density plot), míg egyszeresen jelzett minták esetén a megfelelő fluoreszcencia intenzitás – Fsc dot-plot (vagy density-plot) diagrammot használtuk. A kezelt mintában azon sejteket vettük kelidoninra és/vagy IL-6-ra reagáló sejteknek, melyek kívül estek a referenciakapun. A 14. ábra

egyszeresen jelzett minták esetén mutatja be a referenciakapu kiválasztásának, illetve a válaszoló sejtek elkülönítésének folyamatát.



14. ábra: Egyszeresen jelölt áramlási citometriás minták kiértékelése

Az illusztrációként bemutatott density plot diagrammokon a sejtek előre irányuló fényszórásának (FSc) és fluoreszcencia intenzitásának korrelált ábrázolása látható egyszeresen jelzett kezeletlen (A) és kezelt (B) sejteken. A kezeletlen minta esetén meghatározott „referencia-kapu”-t (piros alakzat) átmásolva a kezelt sejtek adatait tartalmazó grafikonra az adott kezelésre válaszoló sejtek elkülöníthetők, arányuk meghatározható. (saját készítésű ábra)

Az egyes fehérjék expressziójának, illetve a STAT3 foszforilációjának vizsgálata során alkalmazott antitestek esetleges aspecifikus kötődését azonos izotípusú, irreleváns antitestek kötődésének vizsgálatával ellenőriztük. Mivel aspecifikus kötődés elhanyagolható volt a specifikus jelhez képest, emellett a változások jellegéből adódóan a fluoreszcencia intenzitások tényleges értékét nem elemeztük az analízis során, így a későbbiekben háttér kontrollként jelöletlen sejtekre vonatkozó adatokat használtuk.

4.8.4. Mikrotubulusok jelölése

A mikrotubulusok jelöléséhez a sejteket fedőlemezen növesztettük 24-lyukú sejttenyésztő edényben, majd további 24 órán keresztül kelidonin, illetve DMSO (kontroll sejtek) jelenlétében tenyésztettük (ld. 4.3.1. fejezet). Az alkaloid kezelést követően a fedőlemezeket nedves kamrába helyeztük, majd háromszori mosással távolítottuk el a tápfolyadék maradékát. A mosás során a fedőlemezekre 200 µl szobahőmérsékletű 0,01 M PBS puffert pipettáztunk, majd két perc után papírtörővel óvatosan eltávolítottuk. A sejteket 200 µl aceton hozzáadásával fixáltuk és permeabilizáltuk (5 perc, szobahőmérsékleten), majd újabb három alkalommal mostuk. A fedőlemezekre 100 µl végtérfogatú jelölő koktélt mértünk, amely

0,01M PBS pufferben hígítva 1 μ l FITC-el konjugált anti- α -tubulin monoklonális antitestet (IgG1 κ , ab64503, abcam), valamint a sejtmag és/vagy a foszforilált STAT3 jelöléséhez használt fluoreszcens reagenseket tartalmazott. A jelölést sötétben, szobahőmérsékleten végeztük. 45 perc elteltével a sejteket háromszor mostuk. Végezetül a fedőlemezekre 5-5 μ l Mowiol-t mértünk, majd óvatosan, a sejtekkel lefelé fordítva tisztított üveg tárgylemezekre helyeztük őket. A mikroszkópos vizsgálatot közvetlenül a jelölés után végeztük.

4.8.5. STAT3 magi transzlokáció kvantitatív analízise

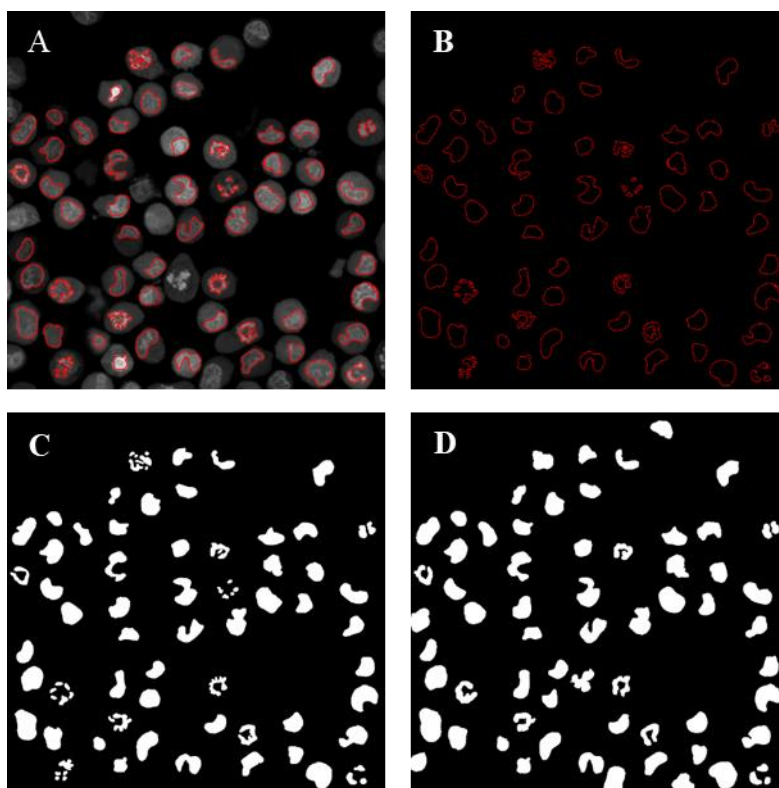
A STAT3 transzkripció faktor magi transzlokációja során a sejtmagot DAPI DNS festékkel jelenítettük meg, míg a foszforilált tirozin- és szerin oldalláncokat a már korábban említett Alexa Fluor 647-konjugált anti-pTyr-STAT3, illetve PE-konjugált anti-pSer-STAT3 monoklonális antitestekkel festettük meg.

Az analízis során magi és teljes-sejt maszkokat készítettünk a FIJI képanalizáló programba beépített „Trainable Weka Segmentation” (továbbiakban WEKA) modul segítségével. A WEKA a pixel alapú szegmentációk előállításához a gépi tanulási algoritmusokat egyesíti az előre meghatározott képjellemzőkkel (Arganda-Carreras et al., 2017). A képszegmentálást Prof. Dr. Nagy Péter segítségével végeztem el.

A folyamat első lépéseként a neuronhálózatot meg kell tanítani az azonosítandó objektumok felismerésére. Ehhez olyan képeket kell bemenetként használni, ahol az objektumok (sejtmagok és teljes-sejt maszkok) azonosítva vannak. A gépi tanulási algoritmus ezeknek a tanuló képeknek a segítségével előállít egy osztályozót („classifier”), amely a későbbiek során már automatikusan elvégzi a képek szegmentálását. A tanításra felhasznált, manuálisan szegmentált képek elkészítéséhez egy táblagépen a LayerPaint HD nevű programban körbe rajzoltuk a sejtmagokat és a sejteket egy adott képen. A kontúrvonalakat külön képrétegen készítettük el, majd az eredeti képpel együtt PSD fájlformátumban elmentettük. A kontúrvonalakat tartalmazó képeket Adobe Photoshop-ban megnyitottuk, az általunk rajzolt kontúr képréteget megjelenítettük és tif fájlformátumban elmentettük. Ezek után a Matlab (Mathworks, Natick, MA) program segítségével feltöltöttük a sejten belüli esetleges üres pixeleket, ezzel előállítottuk a magi és teljes-sejt bináris maszkokat, ahol az 1-ek a sejtnak vagy a sejtmagnak, míg a 0-k a háttérnek feleltek meg.

Az általunk készített bináris maszkokat és az eredeti képet betöltöttük a FIJI WEKA modulba, és elkészítettük az osztályozót, ami a gépi tanulás révén már önállóan felismeri a sejtek és sejtmagok kontúráját, így képes megalkotni az egyes analizálandó képek esetén a magi

és teljes-sejt maszkokat. Ennek köszönhetően a többi kép szegmentálása már automatikusan történt. A szegmentálás folyamatát az 15. ábra szemlélteti a magi maszkon keresztül.



15. ábra: A szegmentálás folyamata magi maszk létrehozása során

A manuálisan körbe rajzolt sejtmagok (A) alapján az Adobe Photoshop szoftverrel elkészítettük a magok kontúr képrétegét (B). A Matlab program segítségével feltöltöttük a „lyukakat” (üres pixeleket) és előállítottuk a bináris magi maszkot (C). A WEKA modul gépi tanulás algoritmusával létrehoztunk egy osztályozót, ami automatikusan elvégezte a többi kép szegmentálását. Az osztályozót a tanításra használt képen alkalmazva ellenőrizhetjük az azonosítás minőségét (D). A vizsgálatok során a sejtmagot DAPI festékkel jelöltük meg. (saját készítésű ábra)

Az elemzés további részében a Matlab szoftver segítségével az eredeti képeken meghatároztuk a pixelenkénti fluoreszcencia intenzitásokat, majd a magi és teljes-sejt maszkok használatával kiszámítottuk a teljes sejtre, illetve az adott sejt magjára vonatkozó átlagos fluoreszcencia intenzitásokat. A citoplazmatikus maszkokat úgy állítottuk elő, hogy kivontuk a magi maszkot a teljes-sejt maszkból. Az átlagos fluoreszcencia intenzitást minden esetben korrigáltuk a háttérintenzitással, melyet a sejtmentes területek alapján határoztunk meg. Végezetül az átlagos fluoreszcencia intenzitásokat kétparaméteres dot-plot ábrákon jelenítettük meg.

4.9. Statisztikai elemzések

A különböző kezelések statisztikai elemzéséhez Student-féle, kétmintás t-tesztet használtunk. Az elemzéseket Microsoft Excel beépített modulja segítségével végeztük el. Azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$ volt.

5. EREDMÉNYEK

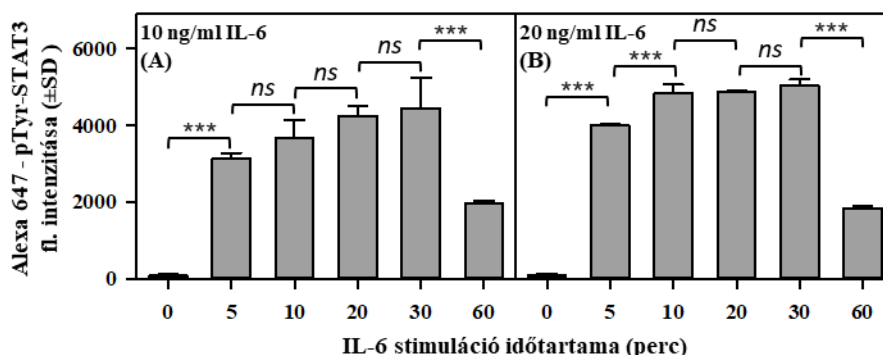
5.1. Kontroll vizsgálatok

5.1.1. IL-6 stimulált STAT3 aktiváció optimalizálása

A STAT3 aktivációja a 705-ös pozícióban elhelyezkedő tirozin oldallánc foszforilálódását jelenti, amelyet a transzkripciós faktor dimerizációja és magi transzlokációja követ. Kísérletes munkánk egyik központi kérdése az volt, hogy a kelidonin miként befolyásolja a STAT3 tirozin foszforilációját, ezért különösen fontos volt, hogy maximalizáljuk az IL-6 stimulációra válaszoló sejtek hányadát, valamint az aktiváció mértékét.

Az optimalizációs vizsgálatokat az OCM-3 sejtvonalon végeztük el. A szakirodalomban fellelhető közlemények jelentős része a STAT3 aktiválásához az 5 és 20 ng/ml közötti IL-6 koncentrációt ajánlja a néhány perctől az egy óráig terjedő időintervallumban (Sun et al., 2012; Wakahara et al., 2012). Optimalizációs kísérleteink első részében a STAT3 aktiváció mértékének az IL-6 stimuláció időtartamától való függését vizsgáltuk, két magasabb (10 és 20 ng/ml) IL-6 koncentráció alkalmazásával. A STAT3 aktiváció mértékét az Alexa Fluor 647-pTyr-STAT3 monoklonális antitest kötődésének áramlási citometriás vizsgálatával követtük nyomon (16. ábra).

Eredményeink alapján a pTyr-STAT3 szint a 10 ng/ml-s IL-6 stimuláció első 30 percében növekvő tendenciát mutatott, majd kb. 30 percnél érte el a maximális mértékét. Ezt követően jelentősen visszaesett, ahogy azt a 60 perces citokin kezelés esetén tapasztalt érték mutatja. A 20 ng/ml IL-6-tal történő kezelés során a 10, 20 és 30 perces citokin kezelések azonos mértékű pTyr-STAT3 szintet eredményeztek. 60 percnél itt is jelentősen csökkent a detektálható pTyr-STAT3 szintje. Ennek megfelelően a későbbiekben a 30 perces IL-6 stimulációt alkalmaztuk a kelidoninnal végzett kísérleteink során.



16. ábra: IL-6 stimulált STAT3 aktiváció időfüggése OCM-3 sejteken

A grafikonok az aktivált STAT3 (pTyr-STAT3) szinttel arányos fluoreszcencia intenzitásokat mutatják az IL-6 stimuláció időtartamának függvényében. A pTyr-STAT3 szintet immunfluoreszcens jelzést követően áramlási citometriával határoztuk meg ($n=10000$ sejt/minta). Az ábrázolt adatok 3 független kísérlet átlagát, illetve a releváns SD értékeket jelentik. Az átlagokat az áramlási citometriás fluoreszcencia intenzitás hisztogramok átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeiből határoztuk meg, amely adott minta esetén az átlagos pTyr-STAT3 szinttel egyenértékű. A p-érték $<0,001$ (***). ns – nem szignifikáns.

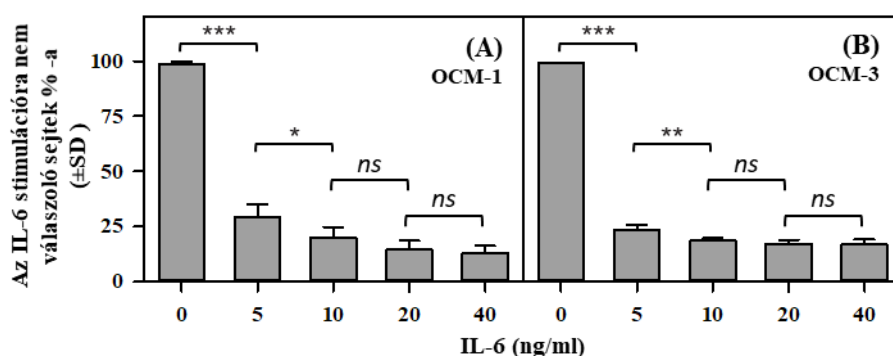
A frissen összegyűjtött OCM-3 sejteket RPMI-ben szuszpendáltuk ($\sim 10^6$ sejt/ml), majd az ábrán feltüntetett időtartamokig 10, illetve 20 ng/ml koncentrációjú IL-6-tal stimuláltuk 37°C -on. A stimulációt követően a sejteket Alexa Fluor 647 fluorofórt hordozó, a pTyr-STAT3-ra specifikus monoklonális antitesttel jelöltük meg, majd áramlási citométerrel határoztuk meg a kötődött antitest mennyiségét.

(IL-6: interleukin-6; pTyr-STAT3: tirozin foszforilált STAT3)

Optimalizációs kísérleteink második részében az IL-6 stimuláció koncentráció függését ellenőriztük az előzőekben meghatározott 30 perces inkubálási időtartam alkalmazásával (17. ábra). OCM-1 sejtek esetén a stimulációra nem válaszoló sejtek hányada csökkenő tendenciát mutatott az IL-6 koncentráció emelésével, bár az egyes koncentrációk (5-10-20-40 ng/ml) között nem volt szignifikáns eltérés. A 20 és 40 ng/ml-es IL-6 koncentrációk esetén az eltérés gyakorlatilag elhanyagolható. OCM-3 sejteknél a csökkenő tendencia a 10 ng/ml IL-6 koncentrációig volt megfigyelhető, a magasabb koncentrációk esetén a nem válaszoló sejtek hányada gyakorlatilag azonosnak tekinthető.

Idő- és koncentráció-függő méréseink eredménye alapján további kísérleteinkben a 20 ng/ml-es IL-6 koncentrációt alkalmaztuk 30 percig a STAT3 aktiválásához.

Fontos megjegyezni, hogy az IL-6 stimulációs vizsgálatok során sosem tapasztaltunk 100%-os válaszkészséget a STAT3 aktiváció vonatkozásában: a sejtek egy minimális hányada még magasabb citokin koncentrációk esetén sem reagált a stimulációra. Ennek a hátterében az állhat, hogy még optimális sejtenyésztési körülmények között is előfordulnak halott vagy haldokló sejtek, emellett a sejtek előkészítése is együtt jár(hat) kismértékű sejtpusztulással, hozzájárulva az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek hányadához.



17. ábra: IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek hányadának koncentrációfüggése

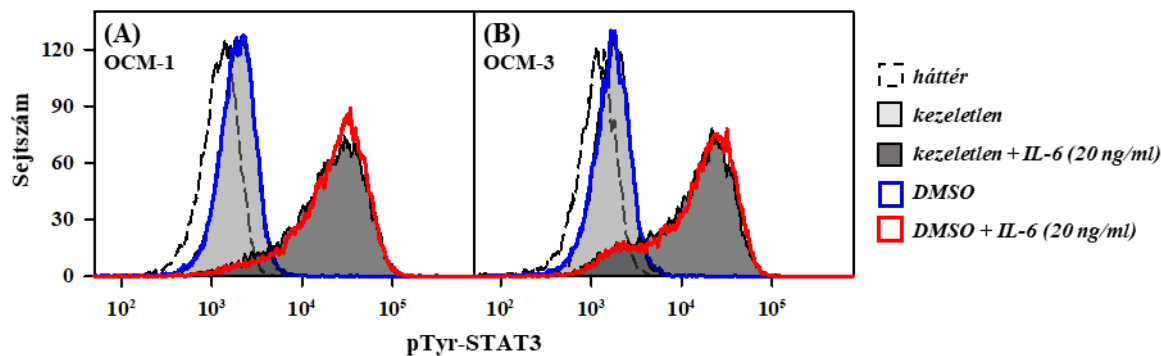
Az oszlopdiagramok az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek hányadát mutatják OCM-1 és OCM-3 sejteken. Az ábrázolt adatok 3 független kísérlet átlagértékét és a releváns SD értékeket jelentik. A p-érték <0,001 (***), <0,01 (**), <0,05 (*). ns – nem szignifikáns.

A frissen összegyűjtött sejteket RPMI-ben szuszpendáltuk (~10⁶ sejt/ml), majd 30 perces IL-6 stimulációnak vetettük alá 37 °C-on, az ábrán feltüntetett koncentrációkat alkalmazva. A stimulációt követően a tirozin foszforilált STAT3-at Alexa Fluor 647-t hordozó anti-pTyr-STAT3 monoklonális antitesttel megjelöltük, majd áramlási citométerrel elemeztük (n=10000 sejt/minta). A kiértékelés során az FSC – Red dot-plot ábrán meghatároztuk az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek arányát (ld. 4.8.3 fejezet). (IL-6: interleukin-6)

5.1.2. DMSO hatása a STAT3 tirozin foszforilációjára

Kísérleteink során a kelidonin hatását vizsgáltuk a IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonalra. Mivel a kelidonin feloldására DMSO-t alkalmaztunk, kritikus kérdés volt annak megválaszolása, hogy a kísérleteinkben alkalmazott DMSO önmagában befolyásolja-e a STAT3 aktiváció mértékét.

Normál körülmények között, valamint DMSO jelenlétében tenyésztett sejteket IL-6 stimulációnak vetettünk alá (30 perc, 20 ng/ml IL-6, 37 °C), majd immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriával vizsgáltuk a STAT3 aktiváció hatékonyságát. A DMSO mennyisége 0,5 v/v% volt, ugyanannyi, mint a kelidoninnal kezelt minták esetén. Az IL-6 stimuláció hatékonyságát (pTyr-STAT3 szint eloszlása) a DMSO nélkül, valamint DMSO jelenlétében tenyésztett sejteken az 18. ábrán bemutatott hisztogramok szemléltetik. Látható, hogy a két esetben a pTyr-STAT3 szintet reprezentáló hisztogramok mind a stimulálatlan, mind pedig az IL-6-tal stimulált sejteken gyakorlatilag teljes mértékben átfednek egymással, azaz az alkalmazott koncentrációban a DMSO STAT3 aktivációt befolyásoló hatása kizárható. Ezek alapján kimondhatjuk, hogy a későbbi, kelidoninnal végzett kísérletek alapján tapasztalt változásokat kizárólag a kelidonin okozta.



18. ábra: A DMSO nem befolyásolja az IL-6 indukált STAT3 aktiváció mértékét

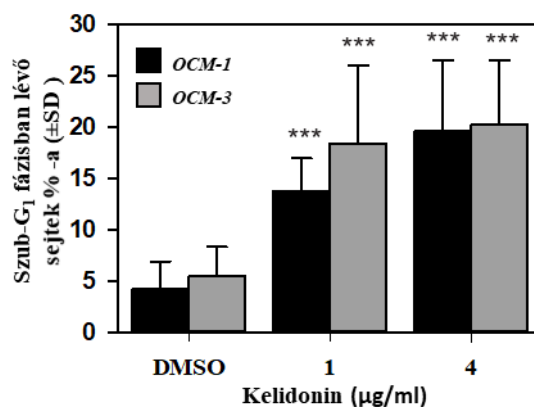
A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok a pTyr-STAT3 szint sejtenkénti eloszlását mutatják DMSO nélkül (szürke tömött hisztogramok), illetve DMSO jelenlétében (színes üres hisztogramok) tenyésztett OCM-1 és OCM-3 sejteken. A világosszürke és kék hisztogramok a stimulálatlan sejteket, míg a sötétszürke és piros hisztogramok az IL-6 stimulált sejteket jelölik. Az üres szaggatott hisztogramok a háttér (kezeletlen és jelöletlen sejtek) jelölik.

A sejteket 24 órán keresztül tenyésztettük DMSO jelenlétében vagy anélkül. IL-6 stimulációt (20 ng/ml, 30', 37 °C) követően a tirozin foszforilált STAT3-at Alexa Fluor 647-t hordozó anti-pTyr-STAT3 monoklonális antitesttel megjelöltük, majd a mintákat áramlási citométerrel elemeztük (n=10000 sejt/minta). (**IL-6**: interleukin-6; **pTyr-STAT3**: tirozin foszforilált STAT3; **DMSO**: dimetil-szulfoxid)

5.2. A kelidonin apoptózist és nekrozist indukál humán uveális melanóma sejteken

A kelidoninról korábban kimutatták, hogy apoptózist és nekrozist vált ki számos daganatos sejtvonalon, ideértve az OCM-1 humán uveális melanóma sejtvonalat is (Kemeny-Beke et al., 2006), azonban az OCM-3 sejtekre gyakorolt hatására vonatkozóan eddig nem volt irodalmi adat. Munkám során ezért egyrészt megismételtem az OCM-1 sejtekre vonatkozó sejthalál vizsgálatokat, másrészt a vizsgálatokat kiterjesztettem az OCM-3 sejtekre is. A kelidonin sejthalált kiváltó hatását a magi DNS fragmentációján, valamint az Annexin V és PI kötődésén alapuló áramlási citometriás módszerekkel tanulmányoztam. Az apoptotikus sejtek különböző tulajdonságai alapján (DNS fragmentáció, foszfatidil-kolin sejtmembrán lokalizációjának megváltozása, ld. 4.6.2. fejezet) mindkét eljárás alkalmas az apoptózis kimutatására. Az Annexin V és PI kombinált alkalmazásával az apoptotikus sejtek mellett és a nekrotikus sejtek is kimutathatók, illetve e két sejtpopuláció elkülöníthető egymástól.

A DNS fragmentációs kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy 24 órás kelidonin kezelés hatására mindkét sejtvonalon szignifikáns módon megemelkedett a töredezett DNS-t tartalmazó, ún. szub-G₁ sejtek százalékos aránya (19. ábra).

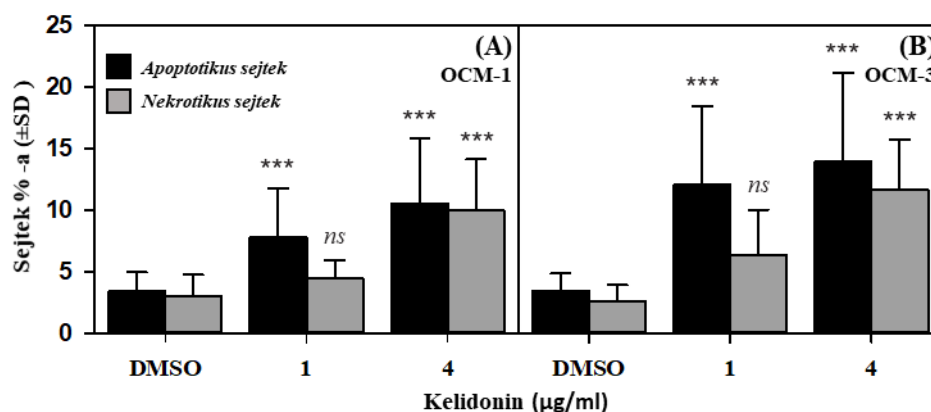


19. ábra: A kelidonin DNS fragmentációt idéz elő OCM-1 és OCM-3 sejteken

Az oszlopdiagram a fragmentált DNS-tartalmú (szub-G₁) sejtek százalékát mutatja a kelidonin koncentráció függvényében OCM-1 (fekete oszlopok) és OCM-3 (szürke oszlopok) sejteken. A diagramon legalább 3 független kísérletből nyert átlagértéket ($\pm$ SD) ábrázoltuk. A p-értéket a kontroll mintákhoz viszonyítva határoztuk meg, ***: $p < 0,001$.

A sejteket 24 órán át tenyésztettük kelidonin, illetve DMSO jelenlétében. A DMSO koncentráció minden esetben 0,5 v/v% volt. A 4.6.1. fejezetben ismertetett módon előkészített sejteket 20 órán keresztül hipotóniás PI oldatban tartottuk (4 °C-on), majd a DNS tartalommal arányos PI fluoreszcenciát áramlási citometriával határoztuk meg (n=10000 sejt/minta). A szub-G₁ sejtek hányadát a PI-fluoreszcencia intenzitás hisztogramon felvett kapu segítségével határoztuk meg (ld. 11. ábra). (DMSO: dimetil-szulfoxid)

Annexin V és PI kötődésének kombinált vizsgálatával egyrészt megerősítettük, hogy a kelidonin koncentráció-függő módon apoptózist indukál mindkét uveális melanóma sejtvonalon. Másrészt kimutattuk, hogy a kelidonin nekrozist is indukál, tekintve, hogy a sejtek egy jelentős hányada mindkét reagensre nézve pozitív volt (20. ábra). A későbbi összehasonlító elemzések során a halott sejtek hányadának az apoptotikus és nekrotikus sejtek összesített százalékát vettük.



20. ábra: A kelidonin apoptózist és nekrozist vált ki az OCM-1 és OCM-3 sejteken

Az oszlopdiagram az apoptotikus (fekete oszlopok) és a nekrotikus (szürke oszlopok) sejtek hányadát mutatja. A diagramon legalább 3 független kísérletből nyert átlagértékeket ($\pm$ SD) ábrázoltuk. A p-értéket a kontrollhoz mintához viszonyítva határoztuk meg, ***: $p < 0,001$; ns: nem szignifikáns.

A sejteket 24 órán át tenyésztettük kelidonin, illetve DMSO jelenlétében. A DMSO koncentráció minden esetben 0,5 v/v% volt. A 4.6.2. fejezetben leírt módon előkészített sejteket Alexa Fluor 647-tel

konjugált Annexin V és PI keverékével megfestettük, majd áramlási citométerrel elemeztük (n=10000 sejt/minta). (DMSO: dimetil-szulfoxid)

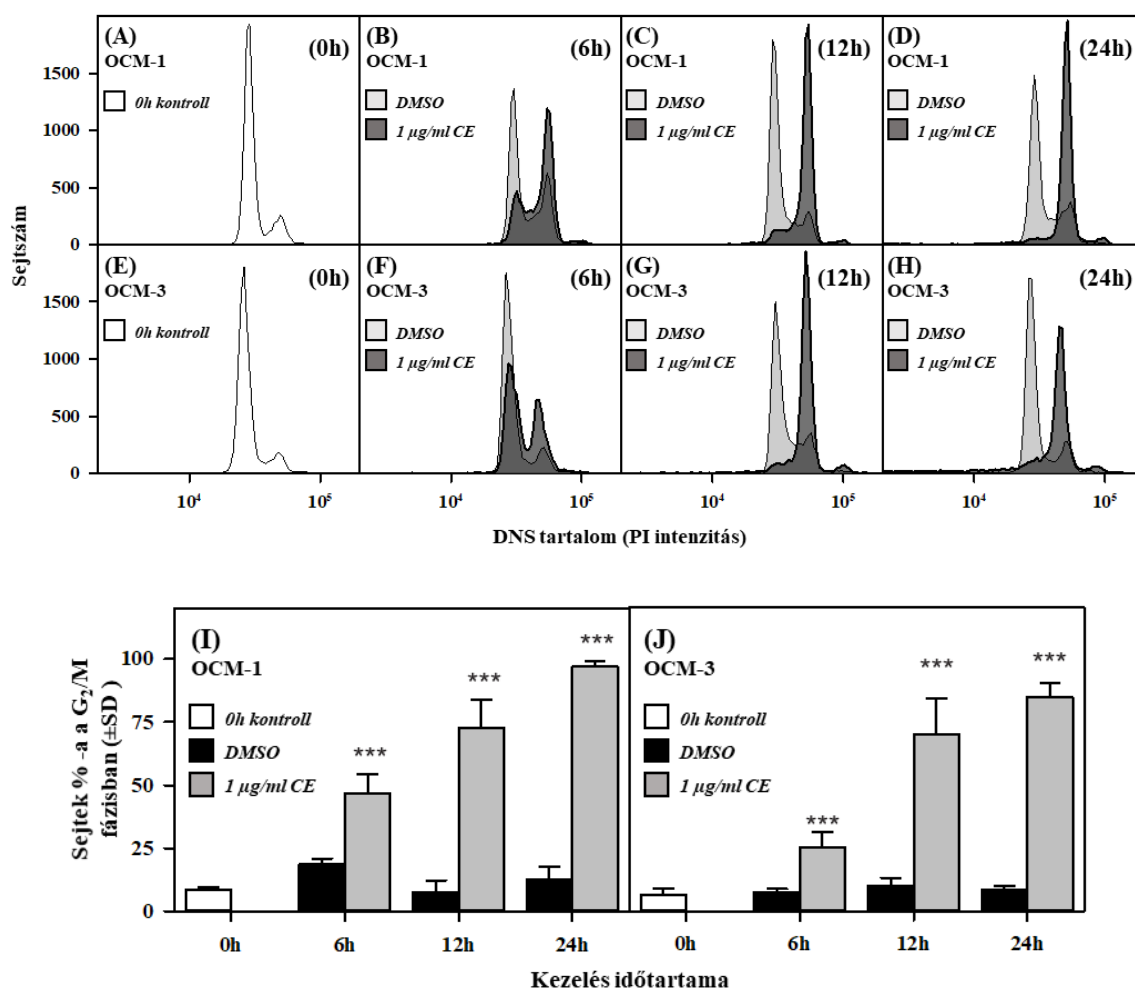
5.3. A kelidonin berekeszti a sejtciklust a G₂/M fázisban és károsítja a mikrotubulusokat

Mint azt Irodalmi áttekintés (2.2.4. fejezet) részben említettem, irodalmi adatok alapján a kelidonin gátolja a mikrotubulusok polimerizációját, emellett a sejtciklust berekeszti a G₂/M fázisban. Kísérleteink következő részében megvizsgáltuk, hogy az általunk vizsgált uveális melanóma sejtvonalakon milyen hatékonysággal és időbeli lefutással alakít ki G₂/M blokkot az alkaloid, illetve ellenőriztük a mikrotubuláris rendszer összeszerelődésére gyakorolt hatását is.

A sejtciklusra gyakorolt hatást célzó kísérletek során ugyanazt a protokollt követtük, mint a DNS fragmentáció vizsgálatakor (ld. 4.6.1. fejezet), mivel ezzel a módszerrel a PI fluoreszcencia (DNS tartalom) alapján a sejtciklus G₀/G₁, S és G₂/M fázisaiban található sejtek aránya is meghatározható. A sejtciklus vizsgálatok során csak az alacsonyabb alkaloid koncentrációt (1 µg/ml) alkalmaztuk, amely a sejtek életképességét, s így a sejtciklus egyes fázisaiban történő megoszlásuk analízisét kevésbé befolyásolja.

Az áramlási citometriás adatok kiértékelése során, a PI intenzitás hisztogramokon a sejtek DNS tartalma alapján meghatároztuk a sejtciklus egyes fázisaiban lévő sejtek arányát 6, 12 és 24 órás alkaloid kezelést követően. A kelidonin kezelés hatását minden esetben egy „nulla óráss” kontroll mintához viszonyítottuk, melyet frissen passzált, kezeltlen sejtekből állítottunk elő.

Ahogy azt a 21. ábra is mutatja, a frissen passzált sejtek csupán kis hányada tartózkodott a G₂/M fázisban. Mindkét sejtvonalon kimutattuk, hogy a G₂/M fázisban csapdázott sejtek aránya monotonon nő a kelidonin kezelés időtartamának növelésével. Az OCM-1 sejtek esetén már a legrövidebb, 6 órás kelidonin kezelés is jelentős G₂/M blokkot eredményezett, ami a hosszabb kezelési időtartamokkal tovább emelkedett. 24 órás kezelést követően az OCM-1 sejtek közel 100%-a található a G₂/M fázisban. Az OCM-3 sejtekben a kelidonin hatása valamivel mérsékeltebb volt. A 6 órás kezelés során a sejtek csupán ~25%-a csapdázódott a G₂/M fázisban, majd ez az érték a 24 órás kezelés után kismértékben 80% fölé emelkedett. (21. ábra).



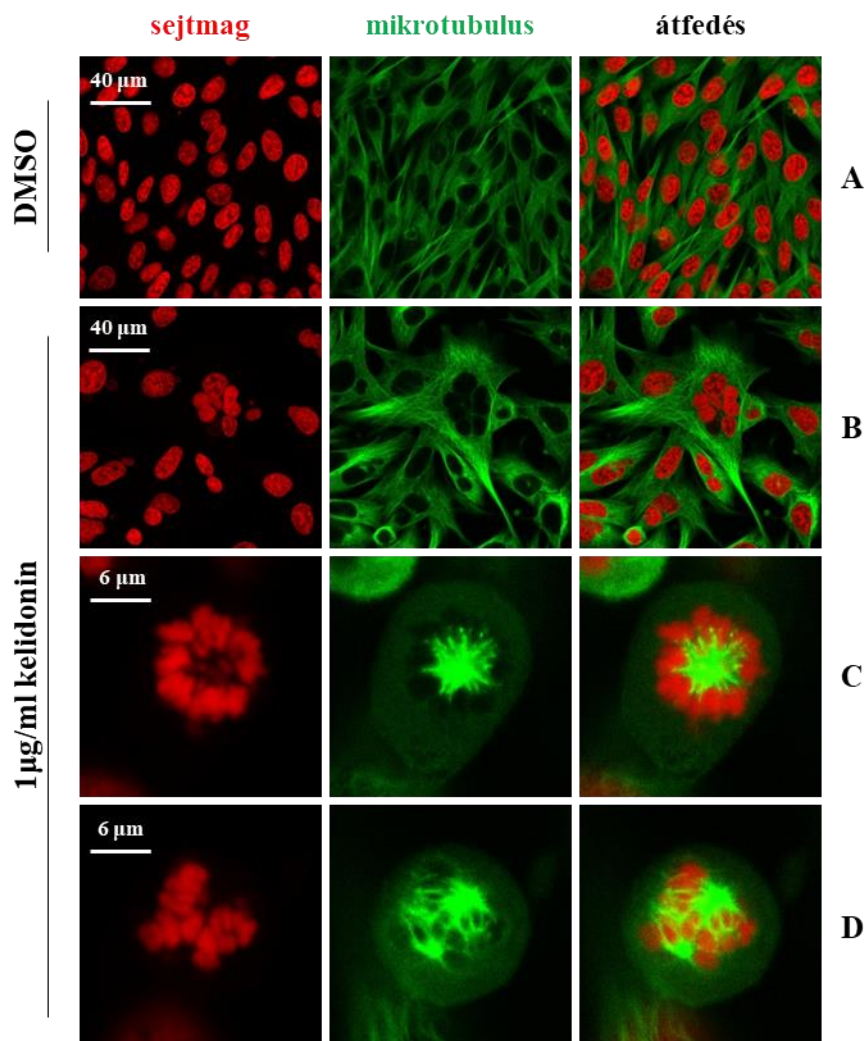
21. ábra: A kelidonin berekeszti a sejtciklust a G₂/M fázisban

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok az OCM-1 (A-D) és OCM-3 (E-H) sejtek eloszlását mutatják a sejtciklus egyes fázisaiban csak DMSO (világosszürke hisztogramok), illetve kelidonin (sötétszürke hisztogramok) jelenlétében növesztett sejteken. A frissen gyűjtött, kezeletlen sejtekre jellemző sejtciklus eloszlást az üres hisztogramok mutatják. Az oszlopdiagramok a G₂/M fázisban található OCM-1 (I) és OCM-3 (J) sejtek százalékos arányát mutatják csak DMSO-val (fekete oszlopok), illetve kelidoninnal (szürke oszlopok) kezelt sejtek esetén. Az üres oszlopok a frissen összegyűjtött, kezeletlen sejtekre vonatkozó adatokat mutatják. A diagramon legalább 3 független kísérletből nyert átlagértékeket ($\pm$ SD) ábrázoltuk. A p-értékeket az adott időponthoz tartozó kontroll nmintához viszonyítva határoztuk meg. ***: p-érték <0,001.

A sejteket 6, 12 és 24 órán keresztül növesztettük kelidonin, illetve DMSO jelenlétében. A DMSO koncentráció minden esetben azonos volt (0,5 v/v%). Ezt követően az 4.6.1. fejezetben ismertetett módon előkészített sejteket 20 órán keresztül hipotóniás PI oldatban tartottuk (4 °C-on), majd a DNS tartalommal arányos PI fluoreszcenciát áramlási citometriával határoztuk meg (n=10000 sejt/minta). A sejtciklus egyes fázisaiban lévő sejtek arányát az FCS Express szoftver saját sejtciklus-elemző moduljával határoztuk meg. (CE: kelidonin; DMSO: dimetil-szulfoxid)

Mivel a sejtciklus szervezésében és végrehajtásában meghatározó szerepet tölt be a mikrotubuláris rendszer, ezért ellenőriztük, hogy a kelidonin miként befolyásolja a mikrotubulusok szerveződését az OCM-1 és OCM-3 sejtekben. Konfokális mikroszkópiás kísérleteinkkel megállapítottuk, hogy kelidonin kezelés hatására a mikrotubuláris hálózat súlyos károsodást szenved, ideértve a kóros mitotikus orsófonalak képződését és a több orsó

pólus kialakulását a mitózis során (22. C és D ábra). Ezeken felül számos, a mitotikus katasztrófára jellemző többmagvú, óriás sejtet is azonosítottunk (22. B ábra).



22. ábra: A kelidonin roncsolja a mikrotubuláris rendszert és több magvú, óriás sejtek megjelenését eredményezi

A reprezentatív konfokális mikroszkópiás képek a sejtmagot (piros szín), illetve a mikrotubulusokat (zöld szín) mutatják DMSO (A), illetve kelidonin (B-C) jelenlétében tenyésztett sejteken.

Az OCM-1sejteket fedőlemezen 1 µg/ml kelidonin vagy DMSO jelenlétében, 24 órán keresztül növesztettük. Az 4.8.4 fejezetben leírt módon a DNS-t propidium jodiddal, míg a tubulint Alexa Fluor 488-anti- α Tubulin monoklonális antitesttel megjelöltük, végül a sejtekről konfokális felvételeket készítettünk. (DMSO: dimetil-szulfoxid)

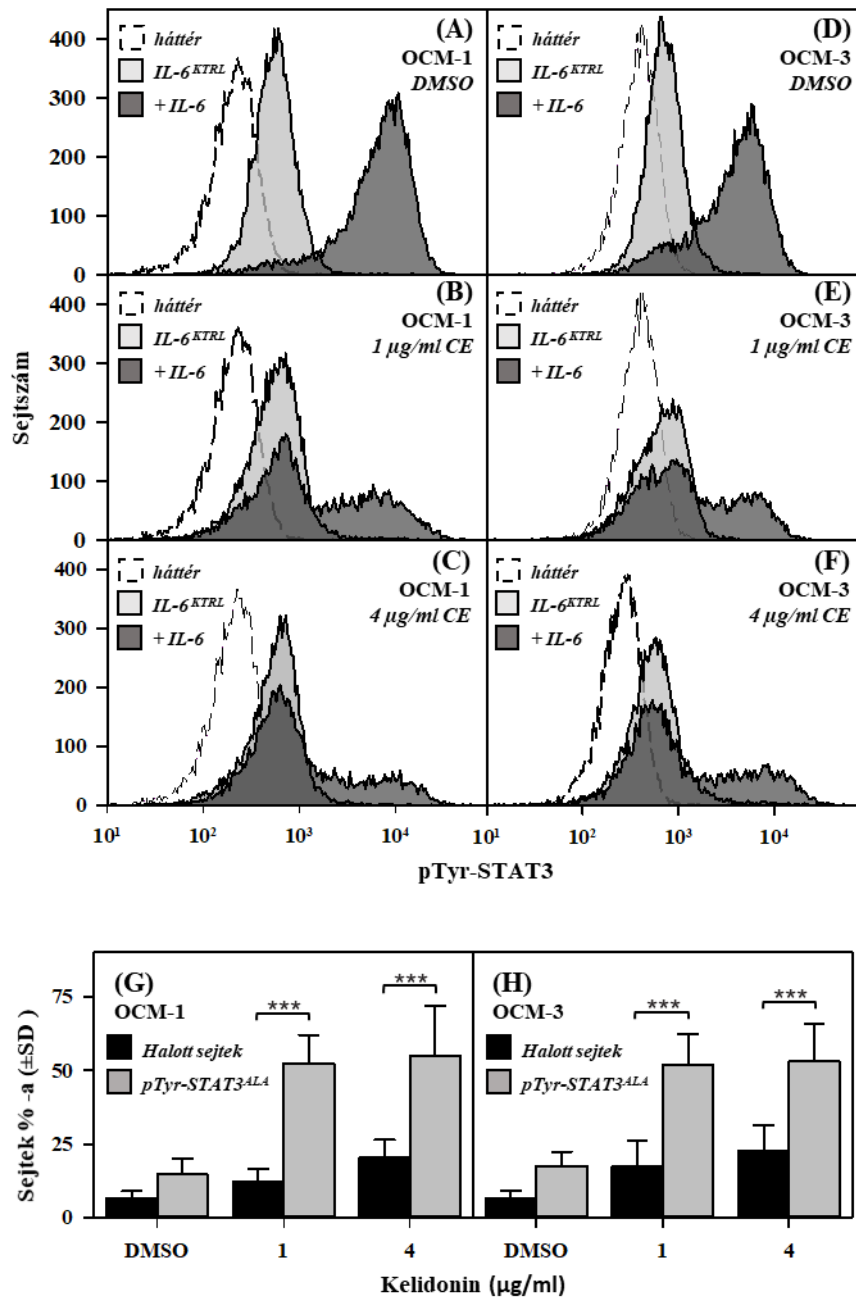
5.4. A kelidonin gátolja az IL-6-indukált STAT3 aktivációt

Következő lépésként megvizsgáltuk miként befolyásolja a kelidonin a STAT3 IL-6 indukált aktivációjának, azaz tirozin foszforilációjának hatékonyságát a két uveális melanóma sejtvonalon. A sejteket 24 órán keresztül kelidonin, illetve a kontroll minták esetén DMSO jelenlétében növesztettük, majd 30 perces IL-6 stimulációnak vetettük alá. A STAT3 aktiváció

hatékonyságát a pTyr-STAT3 immunfluoreszcens jelzését követően áramlási citometriával határoztuk meg.

A korábbi, optimalizációs kísérletek eredményével összhangban, az IL-6 citokinnel történő stimuláció a kontroll (DMSO jelenlétében tenyésztett) sejtek döntő hányadában (OCM-1 sejtek: ~90%, OCM-3 sejtek: ~85%) a pTyr-STAT3 szint megemelkedéséhez, azaz a STAT3 aktivációjához vezetett (23. ábra). Kelidonin kezelés hatására mindkét sejtvonal esetén szignifikánsan megemelkedett az IL-6 stimulációra nem válaszoló, alacsony pTyr-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek százalékos aránya (OCM-1: ~55%, OCM-3: ~50%). A két alkalmazott koncentráció (1 és 4 µg/ml) esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az alkaloid STAT3 aktiváció hatékonyságára kifejtett hatásában. A pTyr-STAT3 bazális (konstitutív), azaz IL-6 stimuláció hiányában detektálható szintjét az alkaloiddal történő kezelés nem befolyásolta szignifikánsan. Fontos megjegyezni, hogy a kelidonin hatása egyfajta „mindent vagy semmit” elvet követett: míg az alacsony válaszkészségű sejtekre jellemző pTyr-STAT3 szint a bazális értékre csökkent, addig a továbbra is válaszképes sejtek esetén a STAT3 IL-6 által kiváltott aktivációja a kontroll sejtek esetén tapasztalt szinten maradt.

Mint ezt az 5.2. fejezetben bemutattam, a 24 órás kelidonin kezelés mindkét alkalmazott dózisban a sejtek egy bizonyos hányadának pusztulásához vezetett. Ugyanakkor az elpusztult sejtek százalékos aránya még a magasabb kelidonin koncentráció (4 µg/ml) esetén is szignifikánsan alacsonyabbnak adódott az alacsony pTyr-STAT3 szinttel rendelkező sejtek hányadánál. Ezeknek az eredményeknek az alapján kizárható, hogy az IL-6 stimuláció iránti csökkent válaszkészség hátterében egyszerűen a sejtek csökkent életképessége áll (23. G és H ábra).



23. ábra: A kelidonin csökkenti az IL-6 által kiváltott STAT3 aktiváció mértékét

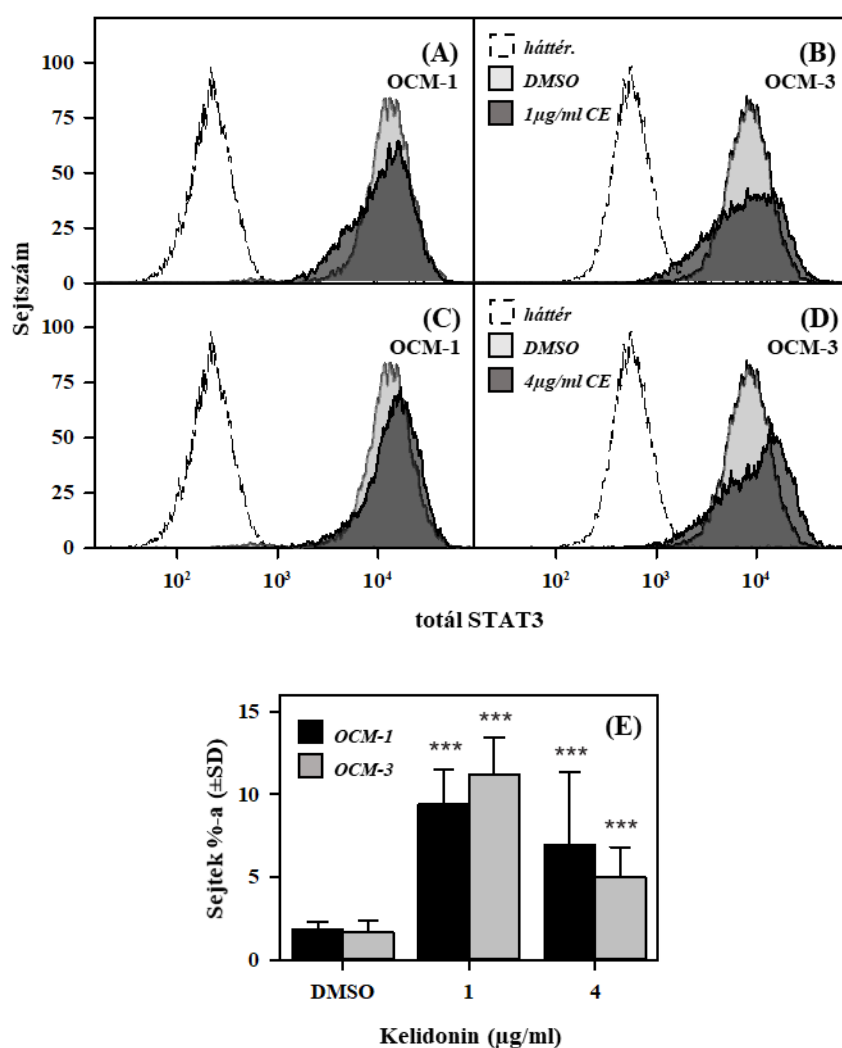
A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok (A-F) a pTyr-STAT3 szint sejtenkénti eloszlását mutatják kelidonin, illetve DMSO jelenlétében tenyésztett OCM-1 (A-C) és OCM-3 (D-F) sejteken. A sötétszürke hisztogramok az IL-6-tal stimulált, míg a világosszürke hisztogramok az IL-6-tal nem stimulált sejteket képviselik. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg. Az oszlopdiagramok (G, H) a csökkent IL-6 válaszképességgel jellemezhető (szürke oszlopok), valamint az elpusztult (fekete oszlopok) sejtek százalékos arányát mutatják.

Az oszlopdiagramon legalább 3 független kísérletből nyert átlagértékeket (±SD) ábrázoltuk. ***: p-érték <0,001 az IL-6-ra nem válaszoló és az elpusztult sejtek hányadának vonatkozásában. Az IL-6 stimulációra nem válaszoló, illetve az elpusztult sejtek hányada kelidonin kezelt sejteken minden esetben szignifikánsan meghaladta a kontroll minták esetén tapasztalt értékeket (p-érték <0,001, az ábrán nem tüntettem fel).

A kelidoninnal (1 vagy 4 µg/ml) vagy DMSO-val 24 órán át kezelt sejteket IL-6 (20 ng/ml) jelenlétében vagy önmagában 30 percig 37°C-on inkubáltuk. A tirozin foszforilált STAT3-at Alexa647-pTyr-STAT3 monoklonális antitesttel megjelöltük, majd áramlási citometriával elemeztük (n=10000).

sejt/minta). (CE: kelidonin; **DMSO**: dimetil-szulfoxid; **IL-6^{KTRL}**: IL-6 stimulálatlan sejtek; **+IL-6**: IL-6 stimulált sejtek; **pTyr-STAT3^{ALA}**: alacsony STAT3 tirozin foszforilációs szint)

A továbbiakban áramlási citometriával megvizsgáltuk, hogy a kelidonin kezelés módosítja-e a STAT3 expressziós szintjét. Ezekben a kísérletekben olyan monoklonális antitesttel végeztünk immunfluoreszcens jelölést, amely a STAT3 fehérjét annak foszforiláltsági állapotától függetlenül felismeri, azaz alkalmas a teljes STAT3 szint feltérképezésére. Áramlási citometriás adataink alapján, bár a sejtek egy részében a STAT3 expresszió csökkent, ezeknek a sejteknek a mennyisége alatta maradt az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek hányadának. A sejtek döntő többségében nem tapasztaltuk a STAT3 expresszió csökkenését, azaz nem a STAT3 expresszió áll a sejtek IL-6 iránti csökkent válaszkészségének hátterében (24. ábra).



24. ábra: Kelidonin hatása a STAT3 expresszióra

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok (A-D) a teljes STAT3 expresszió sejtenkénti eloszlását mutatják DMSO (világosszürke), illetve kelidonin (sötétszürke) jelenlétében tenyésztett sejteken. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg.

Az oszlopdiagram (E) a csökkent STAT3 expresszióval jellemezhető OCM-1 (fekete) és OCM-3 (szürke) sejtek hányadát mutatja. Az ábrázolt adatok legalább három független kísérlet átlag $\pm$ SD értékét jelentik. p-érték <0,001 (***) a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva.

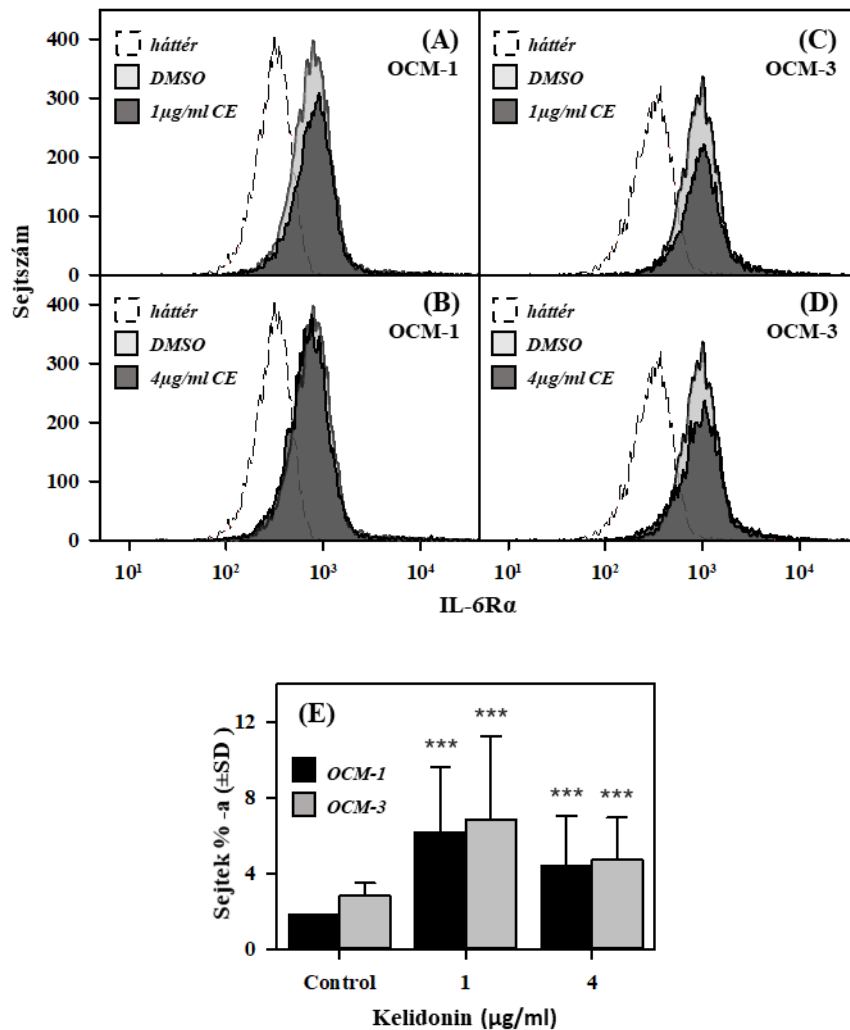
A kelidoninnal (1 vagy 4 μ g/ml) vagy DMSO-val 24 órán át kezelt sejteket PE-konjugált anti-STAT3 monoklonális antitesttel jelöltük meg, majd áramlási citometriával határoztuk meg a teljes STAT3 szintet (n=10000 sejt/minta).

(**CE**: kelidonin; **DMSO**: dimetil-szulfoxid)

5.5. Kelidonin hatására csökken a gp130 alegység expressziója

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a kelidonin miként befolyásolja az IL-6R komplex egyes elemeinek expresszióját. Az IL-6R α , a Jak2 és a gp130 alegységek expresszióját immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriával vizsgáltuk.

A 24 órás kelidonin kezelést követően mindkét sejtvonal esetén detektálható volt egy csökkent IL-6R α (25. ábra) és Jak2 (26. ábra) expresszióval jellemezhető sejhányad. Bár az alacsony IL-6R α és Jak2 expresszióval rendelkező sejtek populációja szignifikánsan nagyobbak adódott a kontroll mintákhoz viszonyítva, az alacsony pTyr-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek frakciója jelentős mértékben meghaladta ezeknek a sejteknek a hányadát.



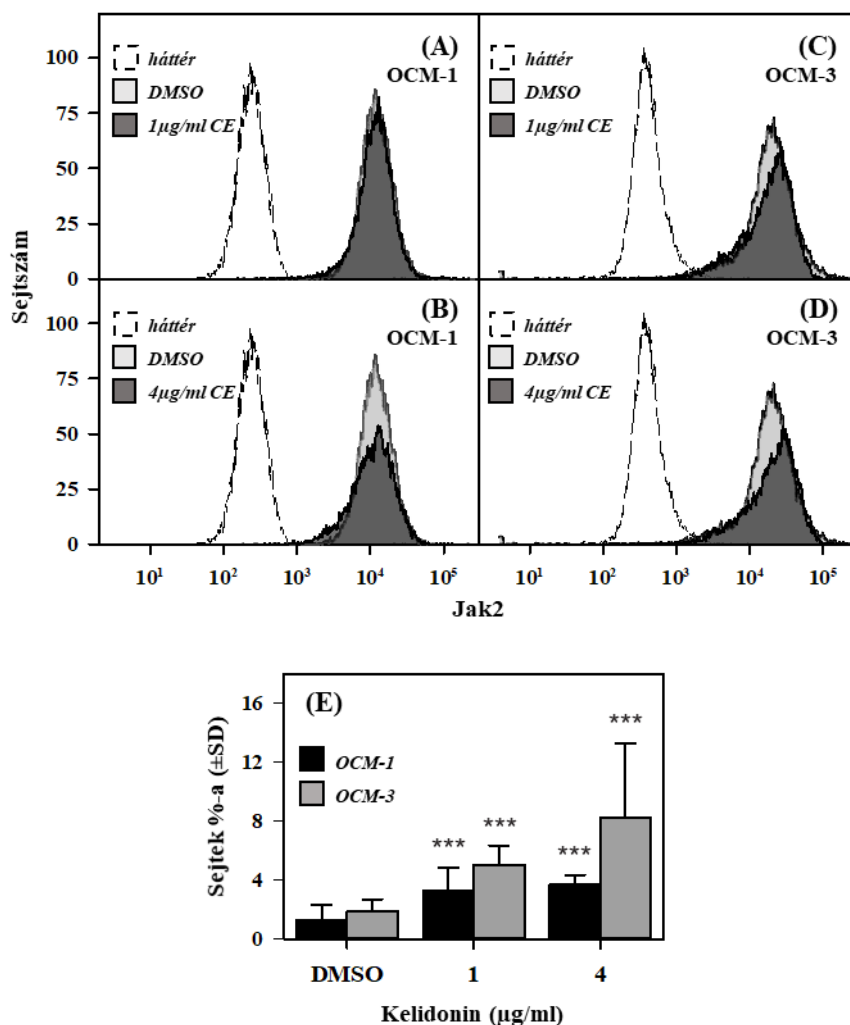
25. ábra: Kelidonin hatása az IL-6Rα expressziójára

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok az IL-6Rα expresszióját mutatják DMSO-val (világosszürke) és kelidoninnal (sötétszürke) kezelt sejtekben. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg

Az oszlopdiagramok a csökkent IL-6Rα expresszióval jellemezhető OCM-1 (fekete) és OCM-3 (szürke) sejtek százalékos arányát mutatják. Az ábrázolt adatok legalább három független kísérlet átlag±SD értékét jelentik. p-érték <0,001 (***) a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva.

A kelidoninnal (1 vagy 4 μg/ml) vagy DMSO-val 24 órán át kezelt sejtekben az IL-6 receptor α alegységét PE-konjugált anti-IL-6Rα monoklonális antitesttel jelöltük meg, majd az IL-6Rα expressziót áramlási citometriával elemeztük (n=10000 sejt/minta).

(CE: kelidonin DMSO: dimetil-szulfoxid; IL-6Rα: IL-6 receptor α alegység)



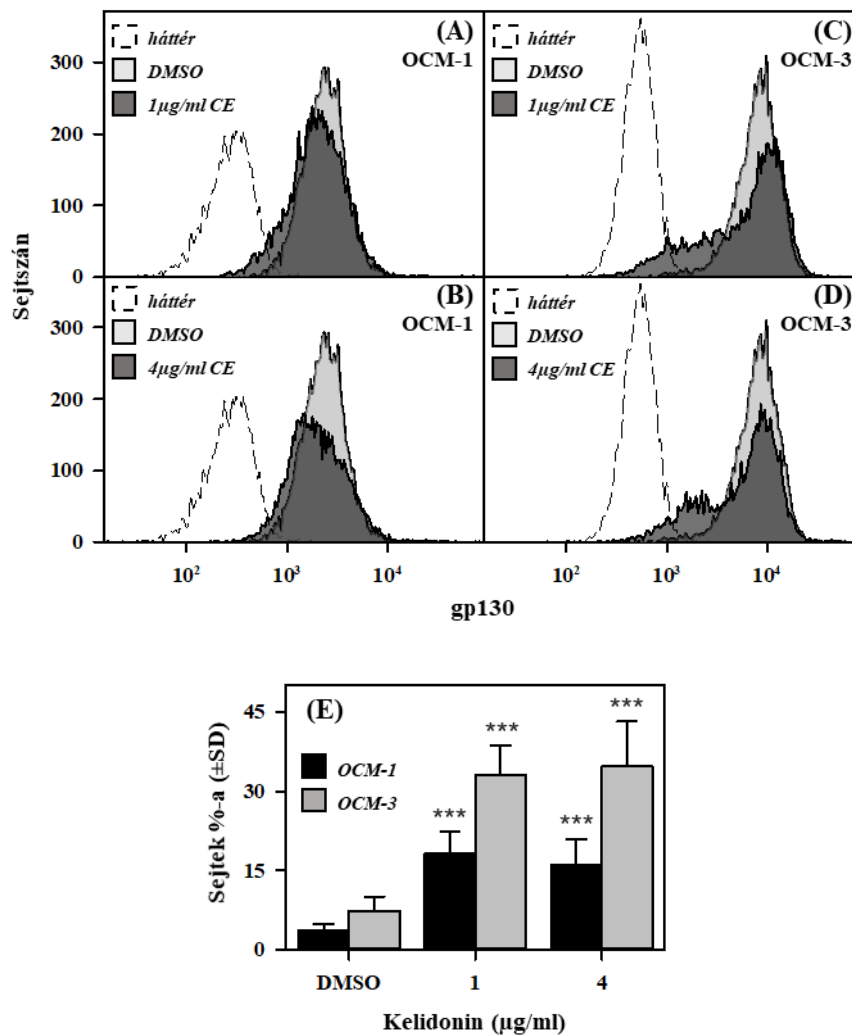
26. ábra: Kelidonin hatása a Jak2 kináz expressziójára

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok a Jak2 expresszióját mutatják DMSO-val (világosszürke) és kelidoninnal (sötétszürke) kezelt sejtekben. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg. Az oszlopdiagramok a csökkent IL-6R α expresszióval jellemezhető OCM-1 (fekete) és OCM-3 (szürke) sejtek százalékos arányát mutatják. Az ábrázolt adatok legalább három független kísérlet átlag $\pm$ SD értékét jelentik. p-érték <0,001 (***) a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva.

A kelidoninnal (1 vagy 4 µg/ml) vagy DMSO-val 24 órán át kezelt sejtekben az IL-6 receptor α alegységét PE-konjugált anti-IL-6R α monoklonális antitesttel jelöltük meg, majd az IL-6R α expressziót áramlási citometriával elemeztük (n=10000 sejt/minta).

(CE: kelidonin DMSO: dimetil-szulfoxid; Jak2: Janus kináz 2)

A gp130 alegységet célzó méréseink során megállapítottuk, hogy a gp130 expressziója, bár különböző mértékben, de mindkét sejtvonal esetén szignifikánsan lecsökkent a kelidonin kezelés hatására. Az érintett sejtek aránya az OCM-3 sejtvonal esetén körülbelül a kétszerese volt az OCM-1 sejtvonalon tapasztaltnál képest (27. ábra).



27. ábra: Kelidonin hatására csökken a gp130 alegység szintje

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok (A-D) a gp130 expressziós szint sejtenkénti eloszlását mutatják DMSO (világosszürke), illetve kelidonin (sötétszürke) jelenlétében tenyésztett sejteken. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg. Az oszlopdiagram (E) a csökkent gp130 expresszióval jellemezhető OCM-1 (fekete) és OCM-3 (szürke) sejtek hányadát mutatja. Az ábrázolt adatok legalább három független kísérlet átlag $\pm$ SD értékét jelentik. p-érték <0,001 (***) a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva.

A kelidoninnal (1 vagy 4 $\mu\text{g/ml}$) vagy DMSO-val 24 órán át kezelt sejtek gp130 expresszióját PE-konjugált gp130 ellenes monoklonális antitesttel történő jelölést követően áramlási citometriával elemeztük (n=10000 sejt/minta).

(CE: kelidonin; DMSO: dimetil-szulfoxid; gp130: glikoprotein 130)

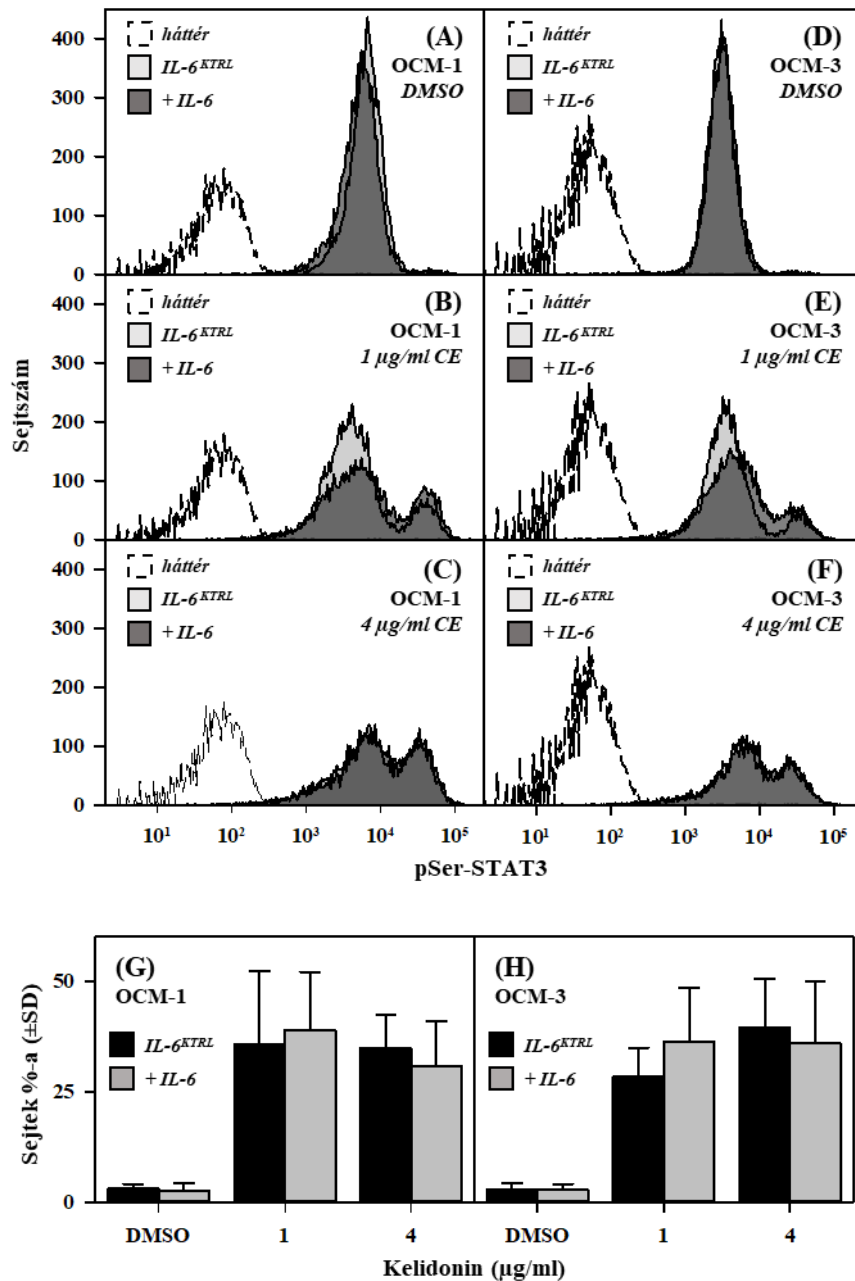
Itt meg kell jegyezni, hogy a tirozin foszforilációnál megfigyelt „mindent-vagy-semmit” elvet a gp130 alegység expressziójának változása során nem tapasztaltuk. Kelidonin kezelés hatására a gp130 kifejeződése csak részlegesen csökken az érintett sejtekben (27. A-D ábra).

5.6. Kelidonin hatására megemelkedik a konstitutív pSer-STAT3 szint

Következő kísérleteinkben a STAT3 másik foszforilációs helyére, a szerin 727 oldalláncra összpontosítottunk. A szerin foszforiláció mértékét PE-nel konjugált, pSer-STAT3 specifikus monoklonális antitesttel történt immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriával határoztuk meg.

Eredményeink alapján mindkét sejtvonalon már IL-6 stimuláció hiányában is kimutatható a STAT3 bazális szerin foszforilációja. IL-6 hatására a szerin foszforiláció mértéke nem vagy csak kismértékben növekedett (28. A és D ábra).

A konstitutív pTyr-STAT3 szinttel ellentétben, amelyet az alkaloid nem befolyásolt, a STAT3 konstitutív szerin foszforilációjának szintje mindkét sejtvonalon szignifikánsan megemelkedett a kelidoninnal történő kezelés hatására: az OCM-1 sejtek közel felében, míg az OCM-3 sejtek harmadában detektáltunk fokozott pSer-STAT3 szintet. Hasonlóan a kontroll sejtekhez, az IL-6 stimuláció nem, vagy csak elhanyagolható mértékben változtatta meg a szerin foszforiláció mértékét a kelidoninnal kezelt sejteken (28. ábra).



28. ábra: A kelidonin fokozza a STAT3 konstitutív szerin foszforilációjának mértékét

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok (A-F) a pSer-STAT3 szint sejtenkénti eloszlását mutatják IL-6 stimuláció hiányában (világosszürke), illetve IL-6-tal stimulált (sötétszürke) OCM-1 (A-C) és OCM-3 (D-F) sejteken a feltüntetett dózisú kelidonin kezelések esetén. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg. Az oszlopdiagramok a fokozott szerin foszforilációval rendelkező OCM-1 (G) és OCM-3 (H) sejtek százalékat mutatják IL-6 stimuláció hiányában (fekete), illetve IL-6-tal stimulált sejteken (szürke oszlopok). Az ábrázolt adatok legalább három független kísérlet átlag $\pm$ SD értékét jelentik. A p-érték <0,001(***) a kontroll sejthez viszonyítva.

A kelidonin (1 vagy 4 µg/ml) vagy DMSO jelenlétében 24 órán át tenyésztett sejteket IL-6 (20 ng/ml) jelenlétében vagy anélkül 30 percig, 37°C-on inkubáltuk. A pSer-STAT3 szintet PE-konjugált anti-pSer-STAT3 specifikus monoklonális antitesttel történő jelölés után áramlási citometriával elemeztük (n=10000 sejt/minta).

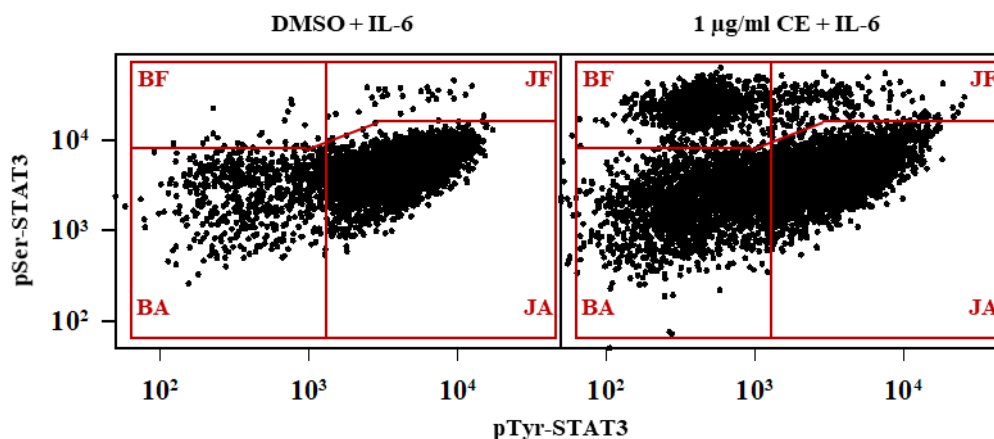
(CE: kelidonin; $IL-6^{CTRL}$: IL-6 stimulálatlan sejtek; $+IL-6$: IL-6 stimulált sejtek; pSer-STAT3: szerin foszforilált STAT3)

5.7. A csökkent STAT3 aktiváció és a megemelkedett pSer-STAT3 szint korrelált vizsgálata

A kelidonin a STAT3 szerin és tirozin foszforilációjára ellentétes hatást fejtett ki. Mindkét hatás csak a sejtek bizonyos hányadát érintette, ezért felmerült a kérdés van-e átfedés az alkaloid kezelésre a STAT3 tirozin, illetve szerin foszforilációja mértékének módosításával válaszoló sejtpopulációk között. Ennek a kérdésnek az eldöntésére a STAT3 két foszforilációs helyét egyidejűleg jelöltük meg spektrálisan eltérő fluorofórt hordozó monoklonális antitestekkel, majd a mintákat áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával analizáltuk.

Mivel az OCM-3 sejtekhez képest az OCM-1 sejtvonalon szignifikánsan magasabb változást mértünk a STAT3 szerin foszforilációjának mértékében alkaloid kezelés hatására, ezeket a kísérleteket az OCM-1 sejtvonalon végeztük el. Azért, hogy az elpusztult sejtek arányát minimalizáljuk, az alacsonyabb, 1 µg/ml kelidonin koncentrációt alkalmaztuk.

Áramlási citometriás adataink alapján a 24 órás kelidonin kezelést követően a megnövekedett bazális pSer-STAT3 szinttel rendelkező sejtek döntő többsége nem válaszolt az IL-6 stimulációra, azaz az érintett sejtpopulációk között átfedés tapasztalható (29. ábra - bal felső kvadráns (BF)). Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy az átfedés csak részleges: (1) egyrészt az IL-6-ra adott válaszreakció elmaradását olyan sejtekben is kimutattuk, ahol nem tapasztalható a konstitutív pSer-STAT3 szint megemelkedése kelidonin hatására (29. ábra – bal alsó kvadráns (BA)); (2) másrészt a megemelkedett pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek egy kisebb hányadában az IL-6 továbbra is képes volt STAT3 aktivációt kiváltani (29. ábra – jobb felső kvadráns (JF)).



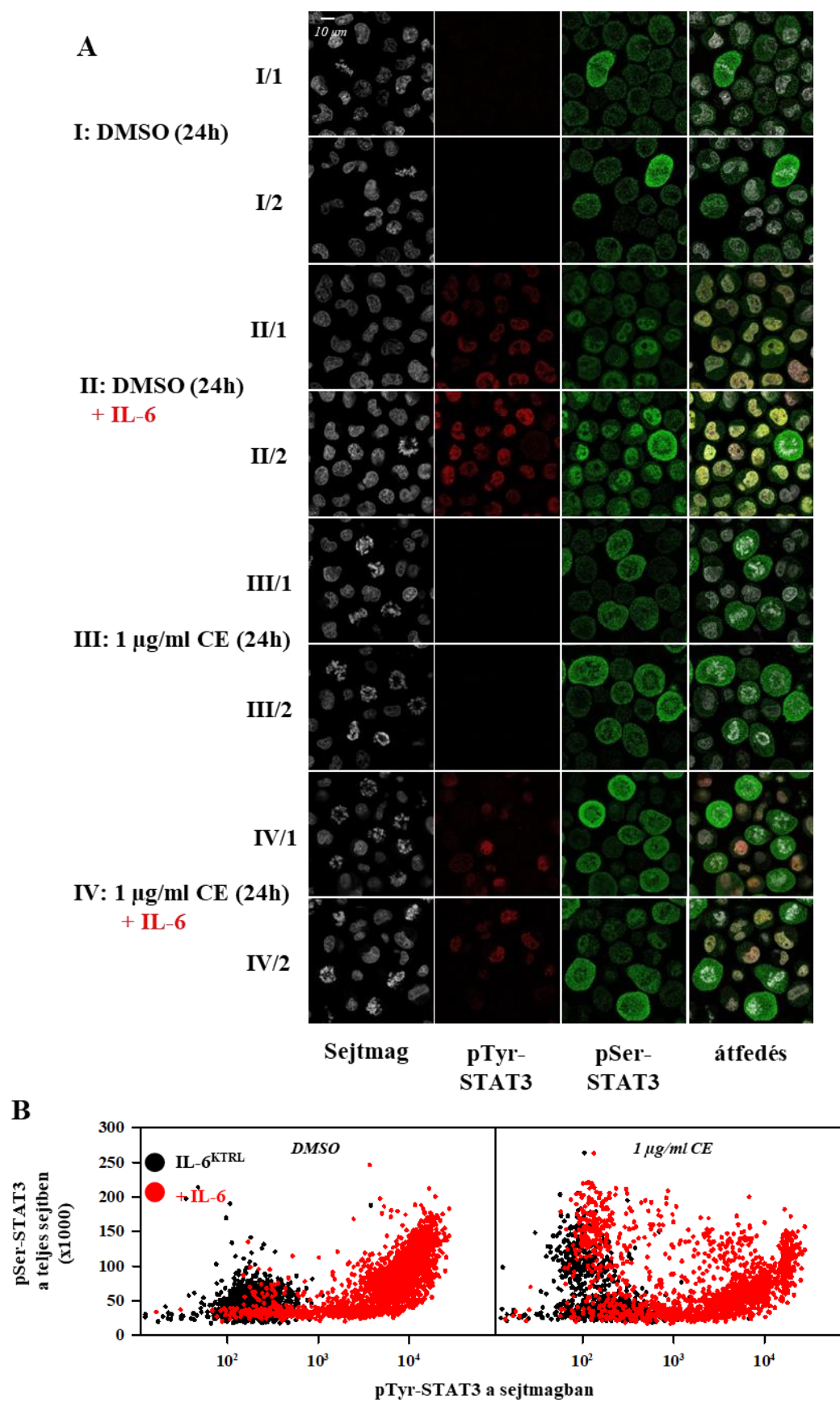
29. ábra: A STAT3 csökkent aktivációjával és a konstitutív pSer-STAT3 szint megemelkedésével jellemezhető OCM-1 sejtpopulációk átfednek

A reprezentatív kétparaméteres „dot-plot” ábra a STAT3 tirozin és szerin foszforilációjának szintjét jeleníti meg korreláltatott formában OCM-1 sejteken. (kvadránsok: **BF** – bal felső, **BA** – bal alsó, **JF** – jobb felső, **JA** – jobb alsó)

A sejteket 24 órán keresztül növesztettük kelidonin (1 µg/ml) vagy DMSO jelenlétében, majd 30 percig IL-6-tal stimuláltuk (20 ng/ml, 37°C). A pTyr-STAT3 specifikus jelzésére Alexa Fluor 647-tel konjugált, míg a pSer-STAT3 specifikus jelzésére PE-nel konjugált monoklonális antitestet használtunk. A mintákat áramlási citométerrel elemeztük (n=10000 sejt/minta).

(**CE**: kelidonin; **DMSO**: dimetil-szulfoxid; **IL-6**: interleukin-6; **pTyr-STAT3**: tirozin foszforilált STAT3; **pSer-STAT3**: szerin foszforilált STAT3)

Konfokális mikroszkópiával szintén megerősítettük a fenti eredményeket: azaz a kelidonin hatására a STAT3 IL-6 által kiváltott tirozin foszforilációjának mértéke csökken, míg konstitutív szerin foszforiláció mértéke növekszik a sejtek jelentős részében és az érintett sejtpopulációk átfedését is kimutattuk. A mikroszkópos analízis előtt DAPI-val megfestettük a sejtek magjait, mely lehetőséget biztosított a STAT3 sejten belüli megoszlásának feltárására (30. A ábra). A WEKA pixel alapú szegmentálási eljárással bizonyítottuk, hogy nemcsak a pTyr-STAT3 szintje, de magi transzlokációjának mértéke is csökken az emelkedett pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek jelentős hányadában (30. B ábra).



30. ábra: A pTyr-STAT3 és a pSer-STAT3 sejten belüli eloszlása

(A) A konfokális mikroszkópos képek a pTyr-STAT3 és pSer-STAT3 szubcelluláris eloszlását mutatják kelidonin (III-IV), illetve DMSO (I-II) jelenlétében tenyésztett OCM-1 sejteken. A STAT3 aktiváció kiváltására IL-6 stimulációt alkalmaztunk (II, IV). Az I és II panelek az IL-6 stimuláció nélküli állapotot mutatják. Az első oszlop képei a DAPI-val (szürke) festett sejtmagokat, míg a második és harmadik oszlopban lévő képek a pTyr-STAT3 (piros) és pSer-STAT3 (zöld) eloszlását mutatják. Az utolsó oszlopban szereplő képek az egyes sejtalkotókra jellemző eloszlások átfedését reprezentálják.

(B) A reprezentatív kétparaméteres „dot-plot” ábrák a magi pTyr-STAT3 és a teljes sejt pSer-STAT3 szintjét mutatják korrelált formában DMSO (bal oldali panel), illetve kelidonin (jobb panel) jelenlétében tenyésztett OCM-1 sejteken. A piros pöttyök az IL-6-tal stimulált, míg a feketék az IL-6-tal nem stimulált sejteknek felelnek meg. Az egyes sejtmagok és teljes sejtek fluoreszcencia értékei legalább 40 képből származnak (az elemzett sejtek száma >1500/minta).

A sejteket 24 órán keresztül DMSO vagy 1 µg/ml kelidonin jelenlétében tenyésztettük. A frissen összegyűjtött sejtek egy részét IL-6 kezelésnek vetettük alá (20 ng/ml, 30 perc, 37 °C), másik részét azonos körülmények között, de IL-6 nélkül tartottuk. A pTyr-STAT3 specifikus jelzésére Alexa Fluor 647-tel konjugált, míg a pSer-STAT3 specifikus jelzésére PE-nel konjugált monoklonális antitestet használtunk. A magok jelöléséhez DAPI-t (0,5 µg/ml) használtunk, melyet közvetlenül a mérés előtt adtunk a fixált sejtekhez.

(CE: kelidonin; DMSO: dimetil-szulfoxid; IL-6: interleukin-6; IL-6^{KTRL}: IL-6 stimulálatlan sejtek; +IL-6: IL-6 stimulált sejtek; pTyr-STAT3: tirozin foszforilált STAT3; pSer-STAT3: szerin foszforilált STAT3)

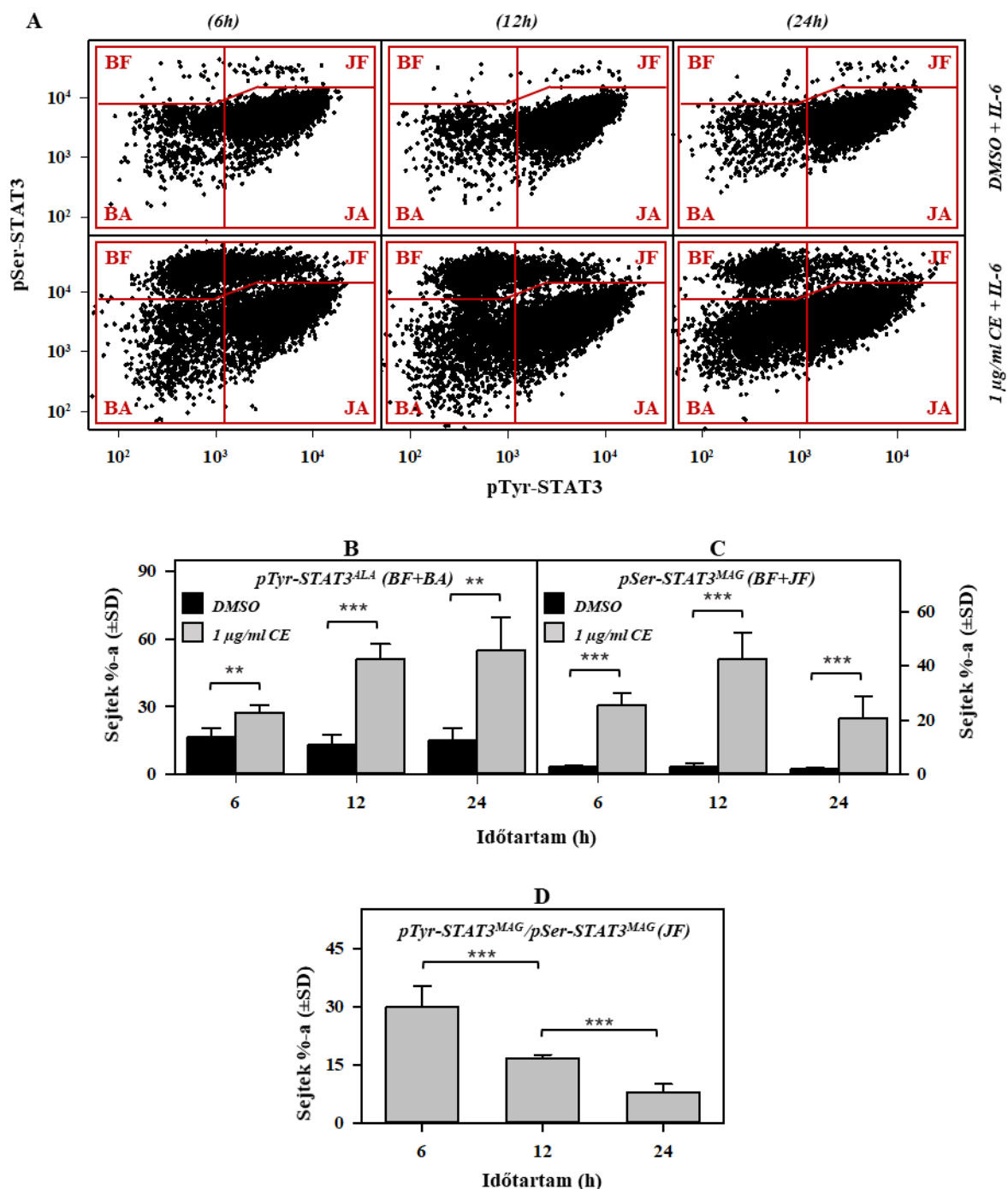
5.8. A kelidonin időfüggő módon befolyásolja a STAT3 foszforilációt OCM-1 sejteken

Kísérleteink egy részében a 24 órás alkaloid kezelés mellett két rövidebb időpontot (6 és 12 óra) is alkalmaztunk, így vizsgáltuk a kelidonin STAT3 tirozin és szerin foszforilációjára gyakorolt hatásának, beleértve az érintett sejtpopulációk átfedésének, időfüggését. Az 5.8. fejezetben leírtaknak megfelelően a STAT3 két foszforilációs helyét egyidejűleg jelöltük meg spektrálisan eltérő fluorofórt hordozó monoklonális antitestekkel, majd a mintákat áramlási citometriával analizáltuk.

Adataink alapján már a 6 órás kelidonin kezelés a sejtek egy alacsony, ugyanakkor a csak DMSO jelenlétében tenyésztett sejtekben detektálthoz képest szignifikánsan magasabb, hányadában megemelte a konstitutív szerin foszforiláció mértékét. Ugyancsak kimutattuk az IL-6 stimulációra adott válaszkészség csökkenésével jellemezhető sejtek hányadának megemelkedését is már a legrövidebb kelidonin kezelést követően (31. A ábra). Az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek százalékos aránya monoton növekedett a kezelés időtartamának függvényében (31. B ábra). Ezzel szemben az emelkedett pSer-STAT3 szinttel rendelkező sejtek hányada a kezdeti emelkedést (6 és 12 órás kezeléseket) követően csökkent (31. C ábra).

Fontos megjegyezni, hogy a 6 órás kezelést követően az emelkedett konstitutív pSer-STAT3 szinttel rendelkező sejtek jelentős hányadában kimutatható volt a STAT3 IL-6 által kiváltott aktivációja, azaz ezek a sejtek megőrizték az IL-6 válaszkészségüket. Ugyanakkor az

IL-6 stimulációra válaszoló sejtek aránya a pSer-STAT3^{MAG} sejtek között monoton csökkent az alkaloid kezelés időtartamának növelésével (31. D ábra).



31. ábra: Kelidonin időfüggő hatása a STAT3 szerin és tirozin foszforilációjának mértékére OCM-1 sejteken

(A) A reprezentatív kétparaméteres „dot-plot” ábra a STAT3 tirozin és szerin foszforilációjának szintjét jeleníti meg korreláltatott formában a feltüntetett időtartamokig DMSO (felső panelek), illetve kelidonin (alsó panelek) jelenlétében tenyésztett OCM-1 sejteken. (kvadránsok: **BF** – bal felső, **BA** – bal alsó, **JF** – jobb felső, **JA** – jobb alsó)

(B) Az oszlopdiagram az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek százalékos arányát mutatja a kezelési idő függvényében DMSO- (fekete), illetve a kelidonin-kezelt (szürke) sejtek esetében.

(C) Az oszlopdiaagram a megemelkedett pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek százalékos arányát mutatja a kezelési idő függvényében DMSO- (fekete), illetve a kelidonin-kezelt (szürke) sejtek esetében.

(D) Az oszlopdiaagram a kelidonin kezelés hatására megemelkedett pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek azon hányadát mutatja a kezelési idő függvényében, amelyekben IL-6 stimuláció hatására STAT3 aktiváció figyelhető meg.

Az ábrázolt adatok legalább három független kísérlet átlag $\pm$ SD értékét jelentik. A p-érték <0,001 (***), <0,01 (**).

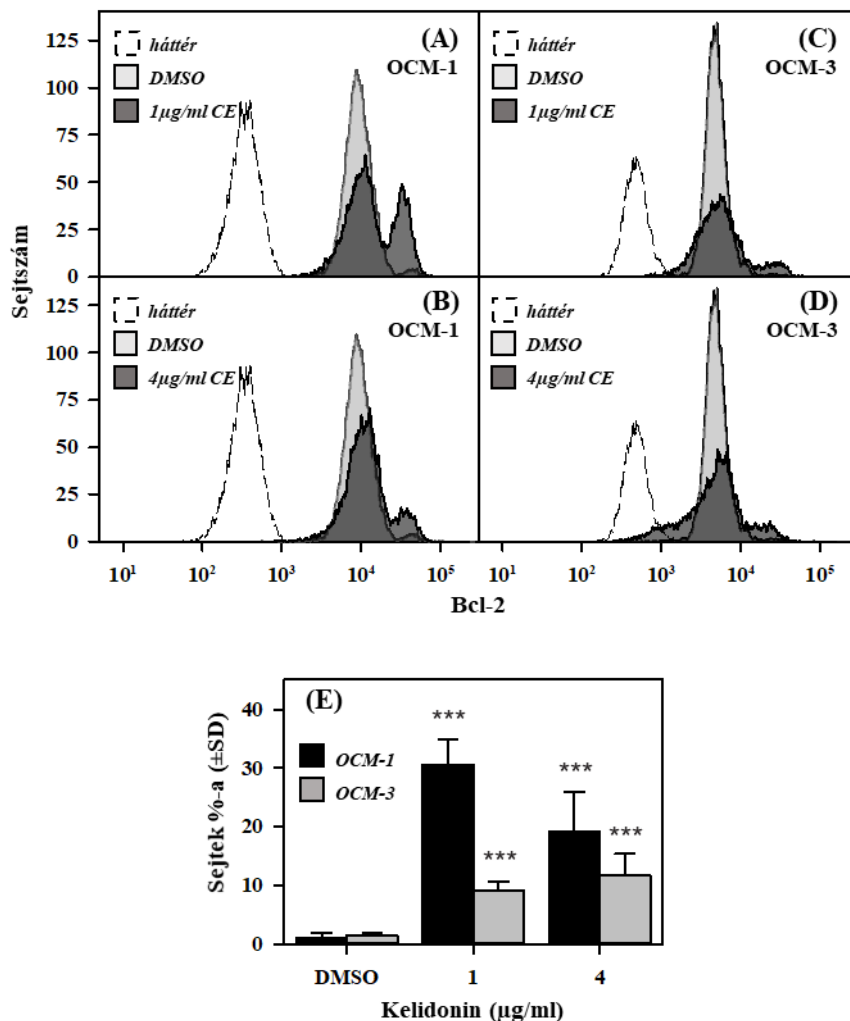
A sejteket 6, 12 vagy 24 órán keresztül kelidonin (1 μ g/ml) vagy DMSO jelenlétében növesztettük, majd IL-6-tal stimuláltuk (20 ng/ml, 30 perc, 37°C). A pTyr-STAT3 specifikus jelzésére Alexa Fluor 647-tel konjugált, míg a pSer-STAT3 specifikus jelzésére PE-nel konjugált monoklonális antitestet használtunk. A mintákat áramlási citométerrel elemeztük (n=10000 sejt/minta).

(CE: kelidonin; **DMSO**: dimetil-szulfoxid; **IL-6**: interleukin-6; **pTyr-STAT3**: tirozin foszforilált STAT3; **pTyr-STAT3^{ALA}**: alacsony pTyr-STAT3 foszforilációs szint; **pTyr-STAT3^{MAG}**: magas pTyr-STAT3 foszforilációs szint; **pSer-STAT3**: szerin foszforilált STAT3; **pSer-STAT3^{MAG}**: magas pSer-STAT3 foszforilációs szint)

5.9. Kelidonin hatására fokozódik a Bcl-2 expressziója

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a STAT3 által szabályozott Bcl-2 fehérje kifejeződését módosítja-e a sejtek kelidonin kezelése.

A Bcl-2 expressziót immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriával határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a kelidonin – bár különböző módon és mértékben – de mindkét sejtvonalon megemelte a Bcl-2 fehérje kifejeződését. OCM-1 sejteken kelidonin kezelés hatására a sejtek egy jelentős hányadában szignifikánsan megemelkedett a Bcl-2 szintje. Érdekes módon a magasabb dózisú (4 μ g/ml) alkaloid kezelésnél az emelkedett Bcl-2 expresszióval jellemezhető sejtek hányada alacsonyabb volt, mint a kisebb (1 μ g/ml) dózisú kezelésnél, de a kontrollhoz viszonyítva itt is szignifikánsnak mondható a növekedés. A kelidonin kezelésnek az OCM-3 sejtekre mérsékeltebb hatása volt, valamint a fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető sejtek frakciója monoton nőtt a kelidonin koncentrációja emelésével (32. ábra).



32. ábra: Kelidonin hatására megjelenik egy fokozott Bcl-2 szinttel jellemezhető sejtpopuláció

A reprezentatív áramlási citometriás hisztogramok (A-D) a Bcl-2 expresszió sejtenkénti eloszlását mutatják DMSO (világosszürke), illetve kelidonin (sötétszürke) jelenlétében tenyésztett sejteke. Az üres hisztogramok a jelöletlen sejteknek (háttér) felelnek meg. Az oszlopdiagram (E) a fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető OCM-1 (fekete) és OCM-3 (szürke) sejtek hányadát mutatja. Az ábrázolt adatok legalább három kísérlet átlag $\pm$ SD értékét jelentik. p-érték <0,001 (***) a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva.

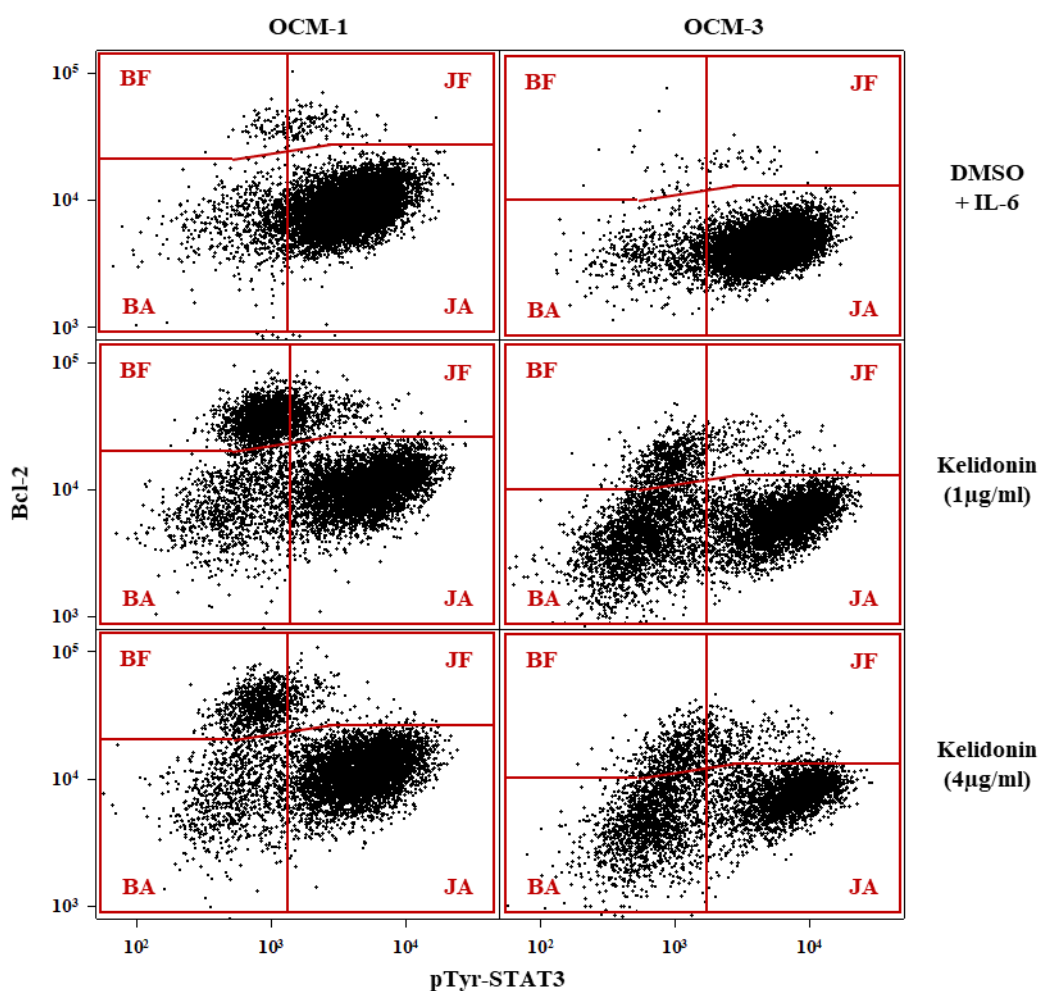
A kelidoninnal (1 vagy 4 µg/ml) vagy DMSO-val 24 órán át kezelt sejtekben a Bcl-2 fehérjét PE-konjugált anti-Bcl-2 monoklonális antitesttel jelöltük meg, majd áramlási citometriával elemeztük az expresszióját (n=10000 sejt/minta).

(**Bcl-2**: B-sejtes limfóma 2 fehérje; **CE**: kelidonin; **DMSO**: dimetil-szulfoxid)

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy van-e átfedés a csökkent STAT3 aktivációval, illetve a fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető sejtek között. Ennek érdekében a tirozin foszforilált STAT3 és Bcl-2 fehérjéket spektrálisan eltérő fluorofórral konjugált monoklonális antitestekkel egyidejűleg megjelöltük, majd az egyes fehérjék szintjét áramlási citometriával vizsgáltuk. Az értekezésben nem bemutatott kontroll vizsgálatok alapján az IL-6 kezelés nem befolyásolta az anti-Bcl2 antitest kötődésének mértékét.

OCM-1 sejtek esetén a fokozott Bcl-2 expresszióval, valamint a csökkent STAT3 aktiválhatósággal jellemezhető sejtpopulációk jelentős átfedését tapasztaltuk (33. ábra, bal oldali panel, bal felső kvadráns (BF)). Azonosítottuk a sejteknek egy olyan kisebb csoportját is, melyekben bár a Bcl-2 expresszió nem változott, az IL-6 válaszreakció elmaradt (33. ábra, bal oldali panel, bal alsó kvadráns (BA)).

OCM-3 sejtek esetén is kimutatható a fokozott Bcl-2 expresszióval, valamint a csökkent STAT3 aktiválhatósággal jellemezhető sejtpopulációk átfedése. Az átfedés mértéke ugyanakkor kisebb, emellett a nem változott Bcl-2 expresszióval és csökkent IL-6 válaszkésziséggel rendelkező sejtek hányada jelentősen meghaladta ezen sejtek arányát (33. ábra, jobb oldali panel, bal felső (BF) és bal alsó (BA) kvadráns).



33. ábra: A csökkent STAT3 aktivációval és a fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető alpopulációk részlegesen átfednek

A reprezentatív két paraméteres „dot-plot” a pTyr-STAT3 szintet és a Bcl-2 expressziót jeleníti meg korreláltatott formában OCM-1(bal oldali panel) és OCM-3 (jobb oldali panel) sejteken. (kvadránsok: **BF** – bal felső, **BA** – bal alsó, **JF** – jobb felső, **JA** – jobb alsó)

A 24 órán keresztül kelidonin (1 és 4 µg/ml) vagy DMSO jelenlétében tenyésztett sejteket IL-6-tal stimuláltuk (20 ng/ml, 30 perc, 37°C), majd a Bcl-2 fehérjét PE-konjugált, míg a pTyr-STAT3-at Alexa

Fluor 647-tel konjugált monoklonális antitesttel jelöltük meg. A sejteket áramlási citométerrel vizsgáltuk meg (n=10000 sejt/minta).
(**Bcl-2**: B-sejtes limfóma 2 fehérje; **DMSO**: dimetil-szulfoxid; **pTyr-STAT3**: tirozin foszforilált STAT3)

6. MEGBESZÉLÉS

A STAT3 jelátvitelét célzó, gyógynövény eredetű szerek alkalmazása ígéretes lehetőség a tumorterápiás eljárásokban (Hu et al., 2021; Talib et al., 2022). Több ilyen szer már használatban van, míg mások klinikai kipróbálás alatt állnak. Az értekezésben bemutatott kísérletekben a benzofenantridin-vázis alkaloidok családjába tartozó kelidonin IL-6/IL-6R/STAT3 jelátvitelre gyakorolt hatását vizsgáltuk két, humán uveális melanóma eredetű sejtvonalon, egyedi sejt szintű információt szolgáltatató módszerekkel.

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a kelidonin koncentrációfüggő módon apoptózist és nekrozist vált ki az OCM-1 humán uveális melanóma sejteken (Kemeny-Beke et al., 2006). DNS fragmentációs, valamint az Annexin és PI kombinált kötődésén alapuló áramlási citometriás kísérleteink alapján az alkaloid hasonló mértékű sejtpusztulást okoz az OCM-3 uveális melanóma sejteken is (19. és 20. ábra).

Irodalmi adatokkal összhangban a kelidonin mindkét sejt esetén berekesztette a sejtciklust a G₂/M fázisban. Ez a hatás már a legrövidebb (6 órás) alkaloid kezelés során jelentkezett, a leghosszabb (24 órás) kezelést követően pedig a sejtek túlnyomó többsége a G₂/M fázisban halmozódott fel (21. ábra). A kelidonin képes beépülni a β -tubulinon elhelyezkedő kolhicin kötőhelyre, így a sejtciklusra gyakorolt hatásának alapja – legalábbis részben – a mikrotubuláris rendszere jellemző dinamikus instabilitás megzavarása lehet (Zhang & Kanakkanthara, 2020).

Mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a kelidonin már az általunk alkalmazott alacsonyabb koncentrációban (1 μ g/ml) is gátolja a mikrotubulusok polimerizációját. Mikrotubulus károsító hatása a sejtciklusban is megmutatkozik: mikroszkópos felvételeken egyértelműen azonosíthatók kóros magorsó fonalak és több orsó pólus megjelenése. Emellett DNS festéssel számos többmagvú óriás sejtet is megfigyeltünk (22. ábra). Ezek a patológiás elváltozások a mitotikus katasztrófa kialakulását sugallják, ami végső soron apoptózis-szerű sejthalálhoz vezet (Mc Gee, 2015). Ezt feltételezést támasztják alá azok az irodalmi adatok, melyek szerint kelidonin kezelés hatására fokozódik a Cdk1 allosztérikus aktivátorának, a ciklin B1-nek a kifejeződése (Panzer et al., 2001; Qu et al., 2016). A ciklin B1/Cdk1 heterokomplex nélkülözhetetlen a G₂/M átmenethez, azonban a komplex kóros mértékű kialakulása és aktivitása korai kromatin kondenzációt és G₂/M blokkot eredményez. A mitózis leállás elhúzódásával, az APC ugyan felszabadulhat a SAC sejtciklus ellenőrzőpont gátlása alól, ami a ciklin B1 degradációjához vezet, és ennek következtében a sejtek kiléphetnek az osztódási

fázisból. Azonban a többmagvú óriás sejtek életképtelenek, ezért a mitotikus katasztrófa következtében elhalnak (Castedo et al., 2004; Chen et al., 2006; Qu et al., 2016).

A mikrotubulus stabilizáló paklitaxelről és a mikrotubulus destabilizáló vinorelbinnről leírták, hogy a STAT3 konstitutív és citokin indukált aktivációját (tirozin foszforilációját) gátolja, míg konstitutív szerin foszforilációjának mértékét fokozza humán emlő-, petefészek- és prosztatarák eredetű sejteken (Walker et al., 2011; Walker et al., 2010). A nokodazol, amely szintén mikrotubulus destabilizáló hatással bír, hasonló módon befolyásolta a konstitutív pSer- és pTyr-STAT3 szintet HeLa és HEK293 sejteken (Shi et al., 2006). Bár a kelidonin a konstitutív pTyr-STAT3 szintjét az általunk vizsgált uveális melanóma sejteken nem befolyásolta, a STAT3 IL-6 indukált aktivációját és konstitutív szerin foszforilációját a felsorolt ágensekkel analóg módon befolyásolta (23. és 28. ábra).

Az idézett közleményekben a STAT3 foszforilációt a sejtek feltárását igénylő biokémiai módszerekkel tanulmányozták, amelyek jellegükből adódóan teljes sejtpopulációra vonatkozó átlageredményt szolgáltatnak. A sejtpopuláción belüli heterogenitások feltárására, valamint különböző paraméterek korrelált vizsgálatára nem adnak módot. Az általunk alkalmazott áramlási citometriás és konfokális mikroszkópiás megközelítésekkel intakt vagy kvázi intakt sejtekről egyedi sejtszintű információ nyerhető. Ily módon kimutattuk, hogy a kelidonin hatása nem homogén a teljes sejtpopulációra nézve: még a leghosszabb (24 órás) alkaloid kezelés is csak a sejtek bizonyos hányadában okozott detektálható változást a STAT3 foszforilációs állapotában. A kelidonin hatásában mind a tirozin, mind pedig a szerin foszforiláció esetén a „mindent vagy semmit” elv érvényesült: a STAT3 foszforilációs állapotát vagy jelentős mértékben megváltoztatta, vagy egyáltalán nem befolyásolta (23. és 28. ábra).

A kelidonin kétfajta STAT3 foszforilációra kifejtett hatása eltérő időkinetikát követett. Az IL-6 stimulációra nem válaszoló (pTyr-STAT3^{ALA}) sejtek hányada monoton növekedett a kezelési idő függvényében. Ezzel szemben a fokozott konstitutív pSer-STAT3 (pSer-STAT3^{MAG}) szinttel jellemezhető sejtek aránya maximummal rendelkező görbe szerint változott: a kezdeti emelkedést követően újból csökkenni kezdett, de a 24 órás kezelést követően is szignifikánsan meghaladta a kontroll esetén tapasztalt értéket (31. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy míg a szerin foszforilációra gyakorolt hatás átmeneti, addig a tirozin foszforiláció gátlása állandó, legalábbis a vizsgálataink időablakában.

Felmerül a kérdés, hogy a STAT3 aktivációra gyakorolt hosszútávú hatás vajon nem a kelidonin okozta sejtpusztulás következménye. Azonban az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek százalékos aránya a magasabb alkaloid koncentráció (4 µg/ml) esetén is jelentős

mértékben meghaladta az elpusztult sejtek arányát, így a STAT3 aktiváció gátlásáért nem a sejtek csökkent életképessége a felelős (23. ábra).

A 24 órás kelidonin kezelés a pSer-STAT3^{MAG} sejtek jelentős hányadában gátolta a transzkripciós faktor IL-6 által kiváltott aktivációját és magi transzlokációját, ami felveti a kétfajta foszforilációra gyakorolt hatás korrelációját (29. és 30. ábra). Fontos megjegyezni azonban, hogy a legrövidebb (6 órás) alkaloid kezelést követően a pSer-STAT3^{MAG} sejtek többségében az IL-6 stimuláció még képes volt STAT3 aktivációt kiváltani. Az IL-6-ra válaszoló pSer-STAT3^{MAG} sejtek százalékos aránya a kezelés időtartamának függvényében monoton csökkent, azaz az érintett populációk átfedése időben egyre kifejezettebbé vált. Az IL-6-ra adott válaszreakció hiányát olyan sejtekben is kimutattuk, melyekben a pSer-STAT3 szint – legalábbis látszólag – nem változott kelidonin hatására (29. és 31. ábra). Feltehetően ebben a populációban található azok a sejtek, amelyekben a pSer-STAT3 szint a kezdeti növekedés után visszatért az eredeti szintre. Eredményeink alapján (i) a kelidonin szerin foszforilációs mechanizmusokba történő beavatkozása időben megelőzi a tirozin foszforiláció gátlásához vezető hatását; (ii) a megemelkedett pSer-STAT3 szint önmagában nem elégséges, de nem is szükséges feltétele a STAT3 aktiválódás elmaradásának.

In vitro és *in vivo* is kimutatták, hogy UV fénnel történő besugárzás a kelidonin, illetve az előzőekben említett mikrotubulos-célzó ágensek hatásához hasonló módon befolyásolja a STAT3 foszforilációs állapotát: a szerin foszforiláció mértékét fokozza, ugyanakkor az EGF által kiváltott tirozin foszforiláció, s következményesen a DNS kötés és transzkripciós aktivitás hatékonyságát csökkenti. A pSer-STAT3 szint megemelkedése a JNK1 kináz UV besugárzás által kiváltott aktiválódásához köthető. Az aktivált JNK1 olyan sejtekben is gátolta a STAT3 tirozin foszforilációját, amelyek szerin helyett alanint tartalmazó STAT3-at expresszáltak, azaz az UV besugárzás által okozott aktiváció gátlás független a szerin foszforilációtól (Lim & Cao, 1999). Ezzel összhangban a paklitaxel STAT3 aktivációt gátló hatása is megmaradt a Ser→Ala mutációt hordozó STAT3-at kifejező sejteken (Walker et al., 2010). Ezek az adatok és saját eredményeink azt valószínűsítik, hogy a kelidonin esetében sincs közvetlen ok-okozati összefüggés a megnövekedett pSer-STAT3 szint és a STAT3 aktiváció gátlása között, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

A pSer-STAT3 szint átmeneti megemelkedését szérum megvonással szinkronizált, majd a G₀/G₁ sejtciklus blokkból kiszabadult, mitotikusan aktív HeLa sejtekben is kimutatták. Ezzel párhuzamosan, szintén tranziens jelleggel, a Cdk1 aktivitása is fokozódott (Shi et al., 2006). A nokodazol által ezekben a sejtekben kiváltott mitotikus blokk Ser→Ala STAT3 mutáció hatására megszűnt, ezzel egyidejűleg a G₂/M átmenetben kritikus Cdc25 foszfatáz

expressziója is csökkent. Mindezek alapján a pSer-STAT3 szint szorosan kontrollált változása (átmeneti megemelkedése) kritikus szerepet tölt be az M-fázis kialakulásában és progressziójában (Shi et al., 2006). Saját vizsgálatainkban is megfigyelhető volt a magasabb pSer-STAT3 szint a sejtek kis százalékában, alkaloid kezelés hiányában is (28. ábra). Ezek a sejtek valószínűsíthetően a mi rendszerünkben is a mitózis kezdeti fázisában lévő sejteket reprezentálták.

Valószínűsíthető, hogy a kelidonin pSer-STAT3 szintjére gyakorolt tranziens hatása a Cdk1 aktivitására jellemző ciklikusságot tükrözi, azaz a kelidonin a Cdk1 aktiválódásához szükséges mechanizmus valamely lépésébe avatkozik be. Gyomorrák sejtekben a Cdk1 aktivátor ciklin B1 mennyiségében szintén átmeneti emelkedést detektáltak kelidonin hatására (Qu et al., 2016), ami alátámasztja a Cdk1 szerepére vonatkozó feltételezésünket. A pSer-STAT3 szint változása nokodazzal kezelt, aktív Cdk1-et tartalmazó HeLa sejtekben is hasonló időfüggést követett (Shi et al., 2006). Mikroszkópos adataink szerint a STAT3 kelidonin indukált szerin foszforilációja feltehetően a citoszolban történik (30. ábra). Bár a ciklin B1/Cdk1 komplexek bizonyos hányada aktiválódást követően gyorsan transzlokálódik a sejtmagba, az aktív komplexek egy része a citoszolban marad, ami a pSer-STAT3 szint megfigyelt emelkedését okozhatja (Gavet & Pines, 2010a, 2010b).

Eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve úgy tűnik, hogy a STAT3 szerin foszforilációjában legalább két, különböző kinázok és regulátor fehérjék részvételét igénylő mechanizmus vesz részt. A STAT3 kanonikus funkcióinak ellátásához, a transzkripció faktor optimális működésének biztosításához szükséges egy bizonyos (konstitutív vagy stimuláció által kiváltott) pSer-STAT3 szint, amely a STAT3 funkció pozitív és negatív szabályozásában egyaránt kritikus. Egyrészt biztosítja a STAT3 maximális transzkripció aktivitását, másrészt a STAT3 aktiváció kellő időben történő „kikapcsolásában” is szerepet játszik (Sakaguchi et al., 2012). Saját vizsgálatainkban a STAT3 konstitutív szerin foszforilációja sem a STAT3 aktiválhatóságát, sem magi transzlokációját nem akadályozta.

A második mechanizmus felelhet a megemelkedett pSer-STAT3 szintért, amelynek a mitózis kezdeti szakaszában van szerepe. Ez a normál sejtciklus szerves része, de különböző stresszhatások, pl. UV-besugárzás, MTA kezelés stb. is kiválthatják vagy felerősíthetik a megemelkedett szintet (Lim & Cao, 1999; Walker et al., 2010). A kelidonin ezt a második mechanizmust bolygatta meg a vizsgált uveális melanóma sejteken, a STAT3 konstitutív szerin foszforilációját nem befolyásolta. Az alkaloid feltehetően bekapcsolta és/vagy felgyorsította a STAT3 szerin foszforilációt végrehajtó, azt pozitívan szabályozó folyamatokat (pl. Cdk1

aktiválódása), ugyanakkor a negatív szabályozó lépéseket nem befolyásolta. Ez utóbbit támasztja alá a hatás átmeneti jellege.

Az időfüggő sejtciklus vizsgálataink eredményei alapján a G₂/M fázisban csapdázódott sejtek aránya jelentősen meghaladta a pSer-STAT3^{MAG} sejtek hányadát a kelidonin kezelés során, függetlenül a kezelés időtartamától (21. és 28. ábra). Ezen adatok megerősítik, hogy a STAT3 fokozott szerin foszforilációja a mitózis kezdeti szakaszához szükséges, és nem feltétele a kelidonin, vagy a kelidoninhoz hasonló MTA-k által kiváltott G₂/M blokk kialakításának.

Láthattuk, hogy sem a sejtek csökkent életképessége, sem pedig a megemelkedett pSer-STAT3 szint nem tehető közvetlenül felelőssé a kelidonin STAT3 aktivációra gyakorolt hatásáért. Eredményeink alapján ugyancsak kizárható az IL-6R α , a Jak2 és a teljes STAT3 expresszióban bekövetkező változás a tirozin foszforiláció gátlás hátterében. Ugyan a felsorolt fehérjék kifejeződése a sejtek egy kis százalékában csökkent kelidonin kezelés hatására, de az érintett sejtek aránya mindkét sejtvonal esetében elhanyagolható volt az IL-6-ra nem válaszoló sejtek hányadához képest (24-26. ábra).

24 órás kelidonin kezelést követően a sejtek egy részében csökkent a gp130 receptor alegység expressziója (27. ábra). Irodalmi adatok alapján a kelidonin gátolja a gp130 expressziót szabályozó Erk2 aktivációt, ami magyarázhatja a gp130 expresszió csökkenését (Bonito et al., 2014; Kim et al., 2015). Az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek százalékos aránya, különösen az OCM-1 sejtek esetén, szignifikánsan meghaladta az alacsonyabb gp130 expresszióval jellemezhető sejtek hányadát. Emellett a gp130 expresszió változása nem követte a „mindent vagy semmit” elvet: az érintett sejteken a gp130 expresszió nem szűnt meg teljesen, ami az IL-6R α változatlan szintjével együtt arra utal, hogy a funkcionális IL-6R komplexek kialakulása továbbra is megtörténhet. Így a gp130 expresszió csökkenése is kizárható a STAT3 aktiváció hiányának elsődleges okaként, ugyanakkor a sejtek IL-6 stimulációval szembeni érzékenységét befolyásolhatja.

A membrán lokalizáció, specifikus membrándoménekkel (pl. lipid tutajok) kialakított állandó vagy éppen átmeneti kapcsolat szerepét számos citokin, így az IL-6 jelátviteli folyamatainak szervezésében kimutatták (Schmidt-Arras & Rose-John, 2021). Saját, az interleukin-9 (IL-9) receptorra vonatkozó STAT aktivációs vizsgálatainkban összefüggést találtunk az IL-9 által kiváltott jelátvitel hatékonysága és az IL-9R komplex membrándomén lokalizációja (lipid raft vs. egyéb membránrégiók) között (*értekezést megalapozó II. cikk*). A sejtciklus különböző fázisaiban jelentős különbség figyelhető meg a plazmamembrán rendezettségében (Denz et al., 2017), ami a receptorok sejtfelszíni szerveződését és jelátviteli folyamataik hatékonyságát is befolyásolhatja. Tekintve a kelidonin sejtciklusra gyakorolt

hatását, nem zárható ki, hogy a STAT3 aktiváció gátlás hátterében membránszerkezeti változások (is) állnak, amelyek a gp130 expresszió csökkenésével együttesen felelhetnek a tapasztalt hatásért. A membrán mitotikus sejtekre jellemző nagyobb mértékű rendezettsége és/vagy az IL-6R alegységek membrán lokalizációjának esetleges megváltozása akadályozhatja a funkcionális receptor komplexek kialakulását. Mindez egy új, érdekes vizsgálati irányt vet fel.

A sejtek túlélésében szerepet játszó, antiapoptotikus Bcl-2 fehérjét kódoló gén a STAT3 transzkripció faktor egyik célgénje, ezért megvizsgáltuk, hogy a kelidonin befolyásolja-e a Bcl-2 expresszióját. Érdekes módon a logikusan várt csökkenés helyett, amely az OCM-3 sejtek egy kis hányadában meg is figyelhető, kelidonin hatására mindkét sejtvonalon megjelent egy fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető alpopuláció (32. ábra). Hasonlóan a pSer-STAT3 szint változásához, az OCM-1 sejtek esetén kifejezettebb volt a hatás mértéke, a sejtek nagyobb hányadában detektáltunk magasabb Bcl-2 expressziót. A Bcl-2 expresszió és a pTyr-STAT3 szint korrelált vizsgálatára vonatkozó kísérleteink feltárták, hogy a fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető sejtpopuláció jelentős hányadában gátolt STAT3 IL-6 által kiváltott aktivációja, szintén a pSer-STAT3 szint esetén tapasztaltakhoz hasonlóan (29. és 33. ábra). További vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy a Bcl-2 és pSer-STAT3 szintek megemelkedése között van-e kapcsolat, illetve a Bcl-2 szint változásának milyen következménye van a kelidonin által kiváltott sejtpusztulás hatékonyságára, védi vagy épp ellenkezőleg, érzékenyíti a sejteket a kelidoninnal szemben. A Bcl-2 fehérjecsalád egy másik antiapoptotikus tagja, az Mcl-1 esetén kimutatták, hogy a STAT3 szerin foszforilációja kritikus a fehérje expressziójában (Liu et al., 2003). Hasonló kapcsolat nem zárható ki a Bcl-2 esetén sem. Valóban, HeLa sejtekben a foszfatidsav az Erk1/2 kinázok aktiválásával a STAT3 szerin foszforilációján keresztül okozott Bcl-2 expresszió növekedést (Choi & Han, 2012; Choi et al., 2009). Emellett a pSer-STAT3 a *bcl-2* gén promóteréhez tirozin foszforiláció hiányában is tudott kötődni. Az Erk2 funkcióját, mint korábban említettem, a kelidonin gátolja (Kim et al., 2015).

Bár a Bcl-2-t antiapoptotikus fehérjeként ismerjük, egyre több közleményben számolnak be ellenkező hatásáról. Melanómás megbetegedésekben klinikai vizsgálatokkal bizonyították, hogy a Bcl-2 fehérjék különösen fontosak az apoptózis rezisztencia kialakulásában (Eberle & Hossini, 2008). Más szerzők azonban kimutatták, hogy a fokozott Bcl-2 expresszió szelektíven a mitokondriális proapoptotikus Bim expresszióját indukálta, ami a daganatos sejtek fokozott érzékenységet eredményezett bizonyos MTAk-val, mint például a docetaxellel szemben (Savry et al., 2013).

A STAT3 transzkripciós faktor a daganatellenes terápiák egyik kiemelt célpontja (El-Readi et al., 2013; Lee & Cheung, 2019). Egyre több bizonyíték kerül a napvilágra azzal kapcsolatban, hogy a STAT3 aktiváció gátlása különböző típusú daganatsejteket érzékenyít a sugár- és a kemoterápiára. Eredményeink, az MTA szerekkel kapcsolatos irodalmi adatokkal együtt, felvetik a kelidonin potenciális alkalmazhatóságát uveális melanómák, illetve feltehetően egyéb, szolid daganatok kombinációs/multimodális terápiájában. Kísérleteink arra is rávilágítanak, hogy a sejtszintű információkat nyújtó módszerek jelentősen segítik a jelátviteli folyamatok megértését. Az áramlási citometria és mikroszkópia kombinált alkalmazása lehetővé tette a STAT3 szerin és tirozin foszforilációjának sejtenkénti összehasonlítását, korrelációjuk vizsgálatát, valamint és az IL-6 és a kelidonin kezelésekre eltérően reagáló alpopulációk megkülönböztetését, ami fontos a daganatellenes hatásmechanizmus megértéséhez.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Itt bemutatott munkám során a kelidonin hatását tanulmányoztam az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonalra humán uveális melanóma sejtvonalakon. Irodalmi adatokkal összhangban kimutattuk, hogy a kelidonin sejthalált vált ki és berekeszti a sejtciklust a G₂/M fázisban. Mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a kelidonin már alacsony koncentrációban is károsítja a mikrotubuláris rendszert, valamint kóros magorsó fonalak és többmagvú óriás sejtek kialakulását eredményezi. Ezek a patológiás elváltozások a mitotikus katasztrófa kialakulását sugallják, ami végső soron apoptózis-szerű sejthalálhoz vezet.

Kimutattuk, hogy a kelidonin gátolja az IL-6 által kiváltott STAT3 aktivációt (tirozin foszforilációt), ugyanakkor növeli a STAT3 szerin foszforilációjának hatékonyságát. Szemben az irodalomban fellelhető, biokémiai módszerekkel nyert adatokkal, az általunk alkalmazott áramlási citometriás és konfokális mikroszkópiás megközelítések lehetővé tették a STAT3 kétféle foszforilációjának sejtenkénti összehasonlítását, valamint a kelidonin kezelésre eltérően reagáló sejtpopulációk azonosítását. Ily módon feltártuk, hogy mindkét hatásban a „mindent vagy semmi” elv érvényesül, azaz a STAT3 foszforilációs állapotát a kelidonin vagy jelentős mértékben megváltoztatta vagy egyáltalán nem befolyásolta.

A kétfajta STAT3 foszforilációra kifejtett hatás eltérő időkinetikát követett. Míg az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek hányada monoton növekedett a kezelési idő függvényében, a fokozott pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek aránya maximummal rendelkező görbe szerint változott. Mindez arra utal, hogy míg a kelidonin szerin foszforilációra kifejtett hatása átmeneti, a STAT3 aktiváció gátlása hosszútávon fennmarad. A kétféle hatás által érintett sejtpopulációk között tapasztaltunk átfedést, ugyanakkor közvetlen ok-okozati összefüggést nem tudtunk kimutatni.

Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal legtöbb elemének expressziója a sejtek döntő többségében nem változott szignifikánsan kelidon hatására. Bár a gp130 expresszió a sejtek egy jelentős hányadában csökkent, a funkcionális IL-6R komplexek ezeken a sejteken is kialakulhatnak. Így a jelátviteli útvonal tagjainak megváltozott expressziója kizárható a STAT3 aktiváció közvetlen okaként.

Kelidonin hatására megjelent egy fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető alpopuláció, amely hasonló mértékű átfedést mutatott az IL-6-ra nem válaszoló sejtpopulációval, mint amit a fokozott pSer-STAT3 szinttel jellemzhető sejtek esetén tapasztaltunk.

8. SUMMARY

In the work presented here, I investigated the effect of chelidonine on the IL-6/IL-6R/STAT3 signaling pathway in human uveal melanoma cell lines. Consistent with the literature, chelidonine induced cell death and trapped cells in the G₂/M phase of the cell cycle. Furthermore, chelidonine disrupted microtubules and led to the formation of abnormal microtubule filaments and multinucleated giant cells. These pathological changes suggest the development of mitotic catastrophe, which eventually leads to apoptosis-like cell death.

Chelidonine enhanced the efficiency of constitutive serine phosphorylation of STAT3 but abolished IL-6-induced activation (tyrosine phosphorylation) and nuclear translocation of the transcription factor. Biochemical techniques previously used to study STAT3 phosphorylation lacked the potential to provide cell-by-cell information. Flow cytometry combined with microscopy allowed us to compare serine and tyrosine phosphorylation of STAT3 on a cell-by-cell basis, to examine their correlation, and to distinguish subpopulations that respond differently to the alkaloid. In this way, we demonstrated that both effects are restricted to a fraction of cells only in an all-or-none fashion. While the loss of IL-6-inducible STAT3 activation was permanent over the time course of our experiments, the increase in pSer-STAT3 level appeared to be a transient effect. A partial overlap was observed between the affected subpopulations; however, no direct connection could be proven.

Chelidonine did not alter the expressions of IL-6R α , Jak2 or STAT3. However, it reduced the level of gp130 in a significant proportion of cells. These cells, however, still expressed gp130, which, together with unchanged level of IL-6R α , suggests that they still harbor functional IL-6R complexes.

We also observed the emergence of a subpopulation of cells with increased levels of Bcl-2, which overlaps with IL-6 unresponsive cells to a similar extent as observed in cells with increased levels of serine phosphorylated STAT3.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

- Aigner, P., Just, V., & Stoiber, D. (2019). STAT3 isoforms: Alternative fates in cancer? *Cytokine*, 118, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.014>
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., & Sebastian Seung, H. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, 33(15), 2424-2426. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx180>
- Avalle, L., Pensa, S., Regis, G., Novelli, F., & Poli, V. (2012). STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *JAKSTAT*, 1(2), 65-72. <https://doi.org/10.4161/jkst.20045>
- Awasthi, N., Liongue, C., & Ward, A. C. (2021). STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *J Hematol Oncol*, 14(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01214-y>
- Bacso, Z., & Eliason, J. F. (2001). Measurement of DNA damage associated with apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, 45(3), 180-186. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20011101\)45:3<180::aid-cyto1161>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20011101)45:3<180::aid-cyto1161>3.0.co;2-v)
- Bacso, Z., Everson, R. B., & Eliason, J. F. (2000). The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res*, 60(16), 4623-4628. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969816>
- Bates, D., & Eastman, A. (2017). Microtubule destabilising agents: far more than just antimitotic anticancer drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 83(2), 255-268. <https://doi.org/10.1111/bcp.13126>
- Bhikha, R. (2018). The Pharmacological Action of Common Herbal Remedies. *American Journal of Internal Medicine*, 6(5). <https://doi.org/10.11648/j.ajim.20180605.13>
- Bonito, N. A., Drechsler, J., Stoecker, S., Carmo, C. R., Seckl, M. J., Hermanns, H. M., & Costa-Pereira, A. P. (2014). Control of gp130 expression by the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Oncogene*, 33(17), 2255-2263. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.159>
- Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E., & Garcia, K. C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, 300(5628), 2101-2104. <https://doi.org/10.1126/science.1083901>
- Bournazou, E., & Bromberg, J. (2013). Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. *JAKSTAT*, 2(2), e23828. <https://doi.org/10.4161/jkst.23828>
- Bronkhorst, I. H., & Jager, M. J. (2012). Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun*, 4(5-6), 454-462. <https://doi.org/10.1159/000334576>
- Buettner, R., Mora, L. B., & Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 8(4), 945-954. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948098>
- Carbia-Nagashima, A., & Arzt, E. (2004). Intracellular proteins and mechanisms involved in the control of gp130/JAK/STAT cytokine signaling. *Jubmb Life*, 56(2), 83-88. <https://doi.org/10.1080/15216540410001668064>
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16), 2825-2837. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207528>
- Chen, B., Cheng, M., Hong, D. J., Sun, F. Y., & Zhu, C. Q. (2006). Okadaic acid induced cyclin B1 expression and mitotic catastrophe in rat cortex. *Neurosci Lett*, 406(3), 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.074>

- Cheng, Y., Feng, J., Zhu, X., & Liang, J. (2019). Cytokines concentrations in aqueous humor of eyes with uveal melanoma. *Medicine (Baltimore)*, 98(5), e14030. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014030>
- Choi, H. J., & Han, J. S. (2012). Overexpression of phospholipase D enhances Bcl-2 expression by activating STAT3 through independent activation of ERK and p38MAPK in HeLa cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1823(6), 1082-1091. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.03.015>
- Choi, H. J., Lee, J. H., Park, S. Y., Cho, J. H., & Han, J. S. (2009). STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells. *Exp Mol Med*, 41(2), 94-101. <https://doi.org/10.3858/emmm.2009.41.2.012>
- Chonov, D. C., Ignatova, M. M. K., Ananiev, J. R., & Gulubova, M. V. (2019). IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. *Open Access Maced J Med Sci*, 7(14), 2391-2398. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.589>
- Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C., & Blenis, J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 17(11), 6508-6516. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6508>
- Colombo, M. L., & Bosio, E. (1996). Pharmacological activities of Chelidonium majus L (Papaveraceae). *Pharmacological Research*, 33(2), 127-134. <https://doi.org/DOI.10.1006/phrs.1996.0019>
- Cools-Lartigue, J., Marshall, J. C., Caissie, A. L., Saraiva, V. S., & Burnier, M. N. (2004). Secretion of interleukin-6 and prostaglandin E-2 during uveal melanoma-monocyte in vitro interactions. *Experimental Eye Research*, 79(4), 451-454. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.05.015>
- Courapied, S., Sellier, H., de Carne Trecesson, S., Vigneron, A., Bernard, A. C., Gamelin, E., Barre, B., & Coqueret, O. (2010). The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem*, 285(35), 26765-26778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092304>
- da Silva Mesquita, R., Kyrylchuk, A., Costa de Oliveira, R., Costa Sa, I. S., Coutinho Borges Camargo, G., Soares Pontes, G., Moura Araujo da Silva, F., Saraiva Nunomura, R. C., & Grafov, A. (2020). Alkaloids of *Abuta panurensis* Eichler: In silico and in vitro study of acetylcholinesterase inhibition, cytotoxic and immunomodulatory activities. *PLoS One*, 15(9), e0239364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239364>
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. D., & Zhao, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol*, 676, 137-147. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0_9
- Decker, T., & Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*, 19(21), 2628-2637. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203481>
- Demaria, M., Camporeale, A., & Poli, V. (2014). STAT3 and metabolism: How many ways to use a single molecule? *International Journal of Cancer*, 135(9), 1997-2003. <https://doi.org/10.1002/ijc.28767>
- Denz, M., Chiantia, S., Herrmann, A., Mueller, P., Korte, T., & Schwarzer, R. (2017). Cell cycle dependent changes in the plasma membrane organization of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1859(3), 350-359. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.12.004>
- Dimri, S., De, S., & De, A. (2017). Approaching non-canonical STAT3 signaling to redefine cancer therapeutic strategy. *Integrative Molecular Medicine*, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.15761/IMM.1000268>
- Dumontet, C., & Jordan, M. A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 9(10), 790-803. <https://doi.org/10.1038/nrd3253>
- Dunavoelgyi, R., Funk, M., Sacu, S., Georgopoulos, M., Zlabinger, G., Zehetmayer, M., & Schmidt-Erfurth, U. (2012). Intraocular activation of angiogenic and inflammatory pathways in uveal melanoma. *Retina*, 32(7), 1373-1384. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318239e299>
- Eberle, J., & Hossini, A. M. (2008). Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. *Current Genomics*, 9(6), 409-419. <https://doi.org/DOI.10.2174/138920208785699571>

- Ebersbach, C., Beier, A. K., Thomas, C., & Erb, H. H. H. (2021). Impact of STAT Proteins in Tumor Progress and Therapy Resistance in Advanced and Metastasized Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/cancers13194854>
- El-Readi, M. Z., Eid, S., Ashour, M. L., Tahrani, A., & Wink, M. (2013). Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and Chelidonium majus alkaloids. *Phytomedicine*, 20(3-4), 282-294. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.11.005>
- Epling-Burnette, P. K., Liu, J. H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y. X., Wang, J. M., Yang-Yen, H. F., Karras, J., Jove, R., & Loughran, T. P. (2001). Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *Journal of Clinical Investigation*, 107(3), 351-361. <https://doi.org/10.1172/Jci9940>
- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., & Evans, S. S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 26(1), 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>
- Flynn, C. M., Kespohl, B., Daunke, T., Garbers, Y., Dusterhoft, S., Rose-John, S., Haybaeck, J., Lokau, J., Aparicio-Siegmund, S., & Garbers, C. (2021). Interleukin-6 controls recycling and degradation, but not internalization of its receptors. *J Biol Chem*, 296, 100434. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100434>
- Folberg, R., Kadkol, S. S., Frenkel, S., Valyi-Nagy, K., Jager, M. J., Pe'er, J., & Maniotis, A. J. (2008). Authenticating cell lines in ophthalmic research laboratories. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(11), 4697-4701. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2324>
- Gai, L. L., Zhu, Y. T., Zhang, C., & Meng, X. F. (2021). Targeting Canonical and Non-Canonical STAT Signaling Pathways in Renal Diseases. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071610>
- Ganan, N. A., Dias, A. M. A., Bombaldi, F., Zygadlo, J. A., Brignole, E. A., de Sousa, H. C., & Braga, M. E. M. (2016). Alkaloids from Chelidonium majus L.: Fractionated supercritical CO₂ extraction with co-solvents. *Separation and Purification Technology*, 165, 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.04.006>
- Gavet, O., & Pines, J. (2010a). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol*, 189(2), 247-259. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909144>
- Gavet, O., & Pines, J. (2010b). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell*, 18(4), 533-543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.013>
- Gong, C. J., Shen, J., Fang, Z. J., Qiao, L., Feng, R. F., Lin, X. M., & Li, S. Y. (2018). Abnormally expressed JunB transactivated by IL-6/STAT3 signaling promotes uveal melanoma aggressiveness via epithelial-mesenchymal transition. *Bioscience Reports*, 38. <https://doi.org/10.1042/Bsr20180532>
- Griewank, K. G., Yu, X., Khalili, J., Sozen, M. M., Stempke-Hale, K., Bernatchez, C., Wardell, S., Bastian, B. C., & Woodman, S. E. (2012). Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25(2), 182-187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.00971.x>
- Guanizo, A. C., Fernando, C. D., Garama, D. J., & Gough, D. J. (2018). STAT3: a multifaceted oncoprotein. *Growth Factors*, 36(1-2), 1-14. <https://doi.org/10.1080/08977194.2018.1473393>
- Han, N., Yang, Z., Liu, Z., Liu, H., & Yin, J. (2016). Research Progress on Natural Benzophenanthridine Alkaloids and their Pharmacological Functions: A Review. *Natural Product Communications*, 11(8), 1181-1188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30725587>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Havelek, R., Seifrtova, M., Kralovec, K., Krocova, E., Tejkalova, V., Novotny, I., Cahlikova, L., Safratova, M., Opletal, L., Bilkova, Z., Vavrova, J., & Rezacova, M. (2016). Comparative cytotoxicity of chelidonine and homochelidonine, the dimethoxy analogues isolated from Chelidonium

- majus L. (Papaveraceae), against human leukemic and lung carcinoma cells. *Phytomedicine*, 23(3), 253-266. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.01.001>
- Hazan-Halevy, I., Harris, D., Liu, Z., Liu, J., Li, P., Chen, X., Shanker, S., Ferrajoli, A., Keating, M. J., & Estrov, Z. (2010). STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood*, 115(14), 2852-2863. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-230060>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1), 1-20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2), 297-314. <https://doi.org/10.1042/bj3340297>
- Heppler, L. N., & Frank, D. A. (2017). Targeting Oncogenic Transcription Factors: Therapeutic Implications of Endogenous STAT Inhibitors. *Trends Cancer*, 3(12), 816-827. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.004>
- Herrmann, R., Roller, J., Polednik, C., & Schmidt, M. (2018). Effect of chelidonine on growth, invasion, angiogenesis and gene expression in head and neck cancer cell lines. *Oncol Lett*, 16(3), 3108-3116. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9031>
- Hibi, M., & Hirano, T. (2000). IL-6 Receptor. <https://doi.org/10.1006/rwcy.2000.17001>
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*, 16(3-4), 249-284. <https://doi.org/10.3109/08830189809042997>
- Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol*, 33(3), 127-148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
- Huang, S. Y. (2007). Regulation of Metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: Clinical implications. *Clinical Cancer Research*, 13(5), 1362-1366. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-06-2313>
- Huynh, J., Chand, A., Gough, D., & Ernst, M. (2019). Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map. *Nature Reviews Cancer*, 19(2), 82-96. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0090-8>
- Jarnicki, A., Putoczki, T., & Ernst, M. (2010). Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? *Cell Div*, 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-14>
- Johnston, P. A., Sen, M., Hua, Y., Camarco, D. P., Shun, T. Y., Lazo, J. S., & Grandis, J. R. (2018). High Content Imaging Assays for IL-6-Induced STAT3 Pathway Activation in Head and Neck Cancer Cell Lines. *Methods Mol Biol*, 1683, 229-244. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_14
- Jonkman, J., Brown, C. M., Wright, G. D., Anderson, K. I., & North, A. J. (2020). Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat Protoc*, 15(5), 1585-1611. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0313-9>
- Kaliki, S., Shields, C. L., & Shields, J. A. (2015). Uveal melanoma: Estimating prognosis. *Indian Journal of Ophthalmology*, 63(2), 93-102. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.154367>
- Kamran, M. Z., Patil, P., & Gude, R. P. (2013). Role of STAT3 in Cancer Metastasis and Translational Advances. *Biomed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/421821>
- Kaul, R., Risinger, A. L., & Mooberry, S. L. (2019). Microtubule-Targeting Drugs: More than Antimitotics. *J Nat Prod*, 82(3), 680-685. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00105>
- Kemeny-Beke, A., Aradi, J., Damjanovich, J., Beck, Z., Facsko, A., Berta, A., & Bodnar, A. (2006). Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer Lett*, 237(1), 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.05.037>
- Kim, K. H., Sederstrom, J. M. (2015). Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, 111, 28.26.21–28.26.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s111>

- Kim, M., Morales, L. D., Jang, I. S., Cho, Y. Y., & Kim, D. J. (2018). Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092708>
- Kim, O., Hwangbo, C., Kim, J., Li, D. H., Min, B. S., & Lee, J. H. (2015). Chelidonine suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 cells by inhibiting formation of the integrin-linked kinase/PINCH/alpha-parvin complex. *Mol Med Rep*, 12(2), 2161-2168. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3621>
- Kishimoto, T., Akira, S., & Taga, T. (1992). Interleukin-6 and Its Receptor - a Paradigm for Cytokines. *Science*, 258(5082), 593-597. <https://doi.org/DOI 10.1126/science.1411569>
- Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A., & Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biology*, 37(9), 11553-11572. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>
- Lee, C., & Cheung, S. T. (2019). STAT3: An Emerging Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111646>
- Levy, D. E., & Darnell, J. E. (2002). STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 651-662. <https://doi.org/10.1038/nrm909>
- Lim, C. P., & Cao, X. (1999). Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem*, 274(43), 31055-31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.31055>
- Lim, C. P., & Cao, X. M. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular Biosystems*, 2(11), 536-550. <https://doi.org/DOI 10.1039/b606246f>
- Liu, H., Ma, Y., Cole, S. M., Zander, C., Chen, K. H., Karras, J., & Pope, R. M. (2003). Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood*, 102(1), 344-352. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3396>
- Lupardus, P. J., Skiniotis, G., Rice, A. J., Thomas, C., Fischer, S., Walz, T., & Garcia, K. C. (2011). Structural Snapshots of Full-Length Jak1, a Transmembrane gp130/IL-6/IL-6R alpha Cytokine Receptor Complex, and the Receptor-Jak1 Holocomplex. *Structure*, 19(1), 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.10.010>
- Ly, L. V., Bronkhorst, I. H., van Beelen, E., Vrolijk, J., Taylor, A. W., Versluis, M., Luyten, G. P., & Jager, M. J. (2010). Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(11), 5445-5451. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5526>
- Mc Gee, M. M. (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm*, 2015, 146282. <https://doi.org/10.1155/2015/146282>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5 1 1-5 1 11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Metcalfe, R. D., Putoczki, T. L., & Griffin, M. D. W. (2020). Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01424>
- Mitani, H., Katayama, N., Araki, H., Ohishi, K., Kobayashi, K., Suzuki, H., Nishii, K., Masuya, M., Yasukawa, K., Minami, N., & Shiku, H. (2000). Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *British Journal of Haematology*, 109(2), 288-295. <https://doi.org/DOI 10.1046/j.1365-2141.2000.02020.x>
- Mukhtar, E., Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2014). Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 13(2), 275-284. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0791>
- Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J. (2012). Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in Immunology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00098>
- Nagarkatti-Gude, N., Bronkhorst, I. H., van Duinen, S. G., Luyten, G. P., & Jager, M. J. (2012). Cytokines and chemokines in the vitreous fluid of eyes with uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(11), 6748-6755. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10123>
- Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., & Fujii, T. (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*, 23(6), 952-961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.7>

- Naugler, W. E., & Karin, M. (2008). The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 14(3), 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.007>
- Ng, D. C., Lin, B. H., Lim, C. P., Huang, G., Zhang, T., Poli, V., & Cao, X. (2006). Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol*, 172(2), 245-257. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503021>
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139(2), 271-279. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90198-o](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90198-o)
- Panzer, A., Joubert, A. M., Bianchi, P. C., Hamel, E., & Seegers, J. C. (2001). The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. *Eur J Cell Biol*, 80(1), 111-118. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00135>
- Pham, T. H., Park, H. M., Kim, J., Hong, J. T., & Yoon, D. (2020). STAT3 and p53: Dual Target for Cancer Therapy. *Biomedicines*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120637>
- Qu, Z., Zou, X., Zhang, X., Sheng, J., Wang, Y., Wang, J., Wang, C., & Ji, Y. (2016). Chelidonine induces mitotic slippage and apoptotic-like death in SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Mol Med Rep*, 13(2), 1336-1344. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4683>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1(3), 1458-1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Rose-John, S. (2012). IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1237-1247. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4989>
- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Rose-John, S. (2021). Blocking only the bad side of IL-6 in inflammation and cancer. *Cytokine*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155690>
- Sakaguchi, M., Oka, M., Iwasaki, T., Fukami, Y., & Nishigori, C. (2012). Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 132(7), 1877-1885. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.45>
- Savry, A., Carre, M., Berges, R., Rovini, A., Pobel, I., Chacon, C., Braguer, D., & Bourgarel-Rey, V. (2013). Bcl-2-Enhanced Efficacy of Microtubule-Targeting Chemotherapy through Bim Overexpression: Implications for Cancer Treatment. *Neoplasia*, 15(1), 49-+. <https://doi.org/10.1593/neo.121074>
- Schett, G. (2018). Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology*, 57, 43-50. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex513>
- Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology*, 64(6), 1403-1415. <https://doi.org/DOI 10.1016/j.jhep.2016.02.004>
- Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2021). Endosomes as Signaling Platforms for IL-6 Family Cytokine Receptors. *Front Cell Dev Biol*, 9, 688314. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.688314>
- Sehgal, P. B. (2000). STAT-signalling through the cytoplasmic compartment - Consideration of a new paradigm. *Cellular Signalling*, 12(8), 525-535. [https://doi.org/DOI 10.1016/S0898-6568\(00\)00098-X](https://doi.org/DOI 10.1016/S0898-6568(00)00098-X)
- Shi, X., Zhang, H., Paddon, H., Lee, G., Cao, X., & Pelech, S. (2006). Phosphorylation of STAT3 serine-727 by cyclin-dependent kinase 1 is critical for nocodazole-induced mitotic arrest. *Biochemistry*, 45(18), 5857-5867. <https://doi.org/10.1021/bi052490j>
- Skiniotis, G., Boulanger, M. J., Garcia, K. C., & Walz, T. (2005). Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol*, 12(6), 545-551. <https://doi.org/10.1038/nsmb941>
- Stark, G. R., Cheon, H., & Wang, Y. X. (2018). Responses to Cytokines and Interferons that Depend upon JAKs and STATs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028555>

- Steinmetz, M. O., & Prota, A. E. (2018). Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 28(10), 776-792. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001>
- Sun, M., Liu, C., Nadiminty, N., Lou, W., Zhu, Y., Yang, J., Evans, C. P., Zhou, Q., & Gao, A. C. (2012). Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion. *Prostate*, 72(1), 82-89. <https://doi.org/10.1002/pros.21409>
- Takizawa, M., Nobuhisa, I., Igarashi, K., Ueno, M., Nakashima, K., Kitamura, T., & Taga, T. (2003). Requirement of gp130 signaling for the AGM hematopoiesis. *Experimental Hematology*, 31(4), 283-289. [https://doi.org/10.1016/S0301-472x\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0301-472x(03)00025-0)
- Talib, W. H., Awajan, D., Hamed, R. A., Azzam, A. O., Mahmud, A. I., & Al-Yasari, I. H. (2022). Combination Anticancer Therapies Using Selected Phytochemicals. *Molecules*, 27(17). <https://doi.org/10.3390/molecules27175452>
- Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2014). The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res*, 2(4), 288-294. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0022>
- Tesoriere, A., Dinarello, A., & Argenton, F. (2021). The Roles of Post-Translational Modifications in STAT3 Biological Activities and Functions. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080956>
- Tolomeo, M., & Cascio, A. (2021). The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020603>
- Tosic, I., & Frank, D. A. (2021). STAT3 as a mediator of oncogenic cellular metabolism: Pathogenic and therapeutic implications. *Neoplasia*, 23(12), 1167-1178. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.10.003>
- Van Ginkel, P. R., Gee, R. L., Walker, T. M., Hu, D. N., Heizmann, C. W., & Polans, A. S. (1998). The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta*, 1448(2), 290-297. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(98\)00133-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(98)00133-5)
- Verhoeven, Y., Tilborghs, S., Jacobs, J., De Waele, J., Quatannens, D., Deben, C., Prenen, H., Pauwels, P., Trinh, X. B., Wouters, A., Smits, E. L. J., Lardon, F., & van Dam, P. A. (2020). The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 41-56. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.002>
- Wakahara, R., Kunimoto, H., Tanino, K., Kojima, H., Inoue, A., Shintaku, H., & Nakajima, K. (2012). Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells*, 17(2), 132-145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01575.x>
- Walker, S. R., Chaudhury, M., & Frank, D. A. (2011). STAT3 Inhibition by Microtubule-Targeted Drugs: Dual Molecular Effects of Chemotherapeutic Agents. *Mol Cell Pharmacol*, 3(1), 13-19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949561>
- Walker, S. R., Chaudhury, M., Nelson, E. A., & Frank, D. A. (2010). Microtubule-targeted chemotherapeutic agents inhibit signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling. *Mol Pharmacol*, 78(5), 903-908. <https://doi.org/10.1124/mol.110.066316>
- Wang, S. W., & Sun, Y. M. (2014). The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). *Int J Oncol*, 44(4), 1032-1040. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2259>
- Wang, X., Tanaka, M., Krstin, S., Peixoto, H. S., & Wink, M. (2016). The Interference of Selected Cytotoxic Alkaloids with the Cytoskeleton: An Insight into Their Modes of Action. *Molecules*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070906>
- Wen, Z. L., Zhong, Z., & Darnell, J. E. (1995). Maximal Activation of Transcription by Stat1 and Stat3 Requires Both Tyrosine and Serine Phosphorylation. *Cell*, 82(2), 241-250. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90311-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90311-9)
- Wolff, J., & Knipling, L. (1993). Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry*, 32(48), 13334-13339. <https://doi.org/10.1021/bi00211a047>

- Wu, M., Song, D., Li, H., Yang, Y., Ma, X., Deng, S., Ren, C., & Shu, X. (2019). Negative regulators of STAT3 signaling pathway in cancers. *Cancer Manag Res*, 11, 4957-4969. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S206175>
- Xie, Y. J., Gao, W. N., Wu, Q. B., Yao, X. J., Jiang, Z. B., Wang, Y. W., Wang, W. J., Li, W., Hussain, S., Liu, L., Leung, E. L., & Fan, X. X. (2020). Chelidonine selectively inhibits the growth of gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells through the EGFR-AMPK pathway. *Pharmacol Res*, 159, 104934. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104934>
- Xiong, A. L., Yang, Z. D., Shen, Y. C., Zhou, J., & Shen, Q. (2014). Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. *Cancers*, 6(2), 926-957. <https://doi.org/10.3390/cancers6020926>
- Xu, N. W., Chen, Y., Liu, W., Chen, Y. J., Fan, Z. M., Liu, M., & Li, L. J. (2018). Inhibition of JAK2/STAT3 Signaling Pathway Suppresses Proliferation of Burkitt's Lymphoma Raji Cells via Cell Cycle Progression, Apoptosis, and Oxidative Stress by Modulating HSP70. *Med Sci Monit*, 24, 6255-6263. <https://doi.org/10.12659/MSM.910170>
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., & Jove, R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*, 14(11), 736-746. <https://doi.org/10.1038/nrc3818>
- Zhang, D., & Kanakkanthara, A. (2020). Beyond the Paclitaxel and Vinca Alkaloids: Next Generation of Plant-Derived Microtubule-Targeting Agents with Potential Anticancer Activity. *Cancers (Basel)*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/cancers12071721>
- Zhang, Z. H., Mi, C. L., Wang, K. S., Wang, Z., Li, M. Y., Zuo, H. X., Xu, G. H., Li, X. Z., Piao, L. X., Ma, J., & Jin, X. J. (2018). Chelidonine inhibits TNF--induced inflammation by suppressing the NF-B pathways in HCT116 cells. *Phytotherapy Research*, 32(1), 65-75. <https://doi.org/10.1002/ptr.5948>
- Zhou, C., Ma, J., Su, M. Y., Shao, D., Zhao, J. N., Zhao, T. J., Song, Z. Y., Meng, Y., & Jiao, P. (2018). Down-regulation of STAT3 induces the apoptosis and G1 cell cycle arrest in esophageal carcinoma ECA109 cells. *Cancer Cell International*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0549-4>
- Zielinska, S., Jezierska-Domaradzka, A., Wojciak-Kosior, M., Sowa, I., Junka, A., & Matkowski, A. M. (2018). Greater Celandine's Ups and Downs-21 Centuries of Medicinal Uses of Chelidonium majus From the Viewpoint of Today's Pharmacology. *Front Pharmacol*, 9, 299. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00299>

9.2. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/435/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csomós István
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10053378

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csomós, I.**, Nagy, P., Filep, C. B., Rebenku, I., Nizsalóczki, E., Kovács, T., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Opposing Effects of Chelidonine on Tyrosine and Serine Phosphorylation of STAT3 in Human Uveal Melanoma Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (23), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312974>
IF: 6.208
2. Nizsalóczki, E., **Csomós, I.**, Nagy, P., Fazekas, Z., Goldman, C. K., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells.
ChemPhysChem. 15 (18), 3969-3978, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201402501>
IF: 3.419

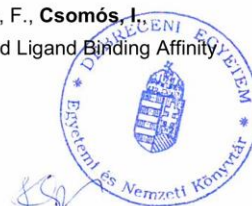
További közlemények

3. Vámos, A., Shaw, A., Varga, K., **Csomós, I.**, Mocsár, G., Balajthy, Z., Lányi, C., Bacsó, Z., Szatmári-Tóth, M., Kristóf, E.: Mitophagy Mediates the Beige to White Transition of Human Primary Subcutaneous Adipocytes Ex Vivo.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (3), 1-21, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15030363>
IF: 5.215 (2021)
4. Shaw, A., Bartáné Tóth, B., Arianti, R., **Csomós, I.**, Pólska, S., Vámos, A., Bacsó, Z., Győry, F., Fésűs, L., Kristóf, E.: BMP7 increases UCP1-dependent and independent thermogenesis with a unique gene expression program in human neck area derived adipocytes.
Pharmaceuticals (Basel). 14 (11), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111078>
IF: 5.215





5. Shaw, A., Bartáné Tóth, B., Király, R., Arianti, R., **Csomós, I.**, Póliska, S., Vámos, A., Korponay-Szabó, I., Bacsó, Z., Győry, F., Fésüs, L., Kristóf, E.: Irisin stimulates the release of CXCL1 from differentiating human subcutaneous and deep-neck derived adipocytes via upregulation of NF[kappa]B pathway.
Front. Cell. Dev. Biol. 9, 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.737872>
IF: 6.081
6. Szatmári-Tóth, M., Shaw, A., **Csomós, I.**, Mocsár, G., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Balajthy, Z., Lányi, C., Győry, F., Kristóf, E., Fésüs, L.: Thermogenic Activation Downregulates High Mitophagy Rate in Human Masked and Mature Beige Adipocytes.
Int. J. Mol. Sci. 21 (18), 1-21, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186640>
IF: 5.924
7. Nizsalóczki, E., Nagy, P., Mocsár, G., Nagyné Szabó, Á. T., **Csomós, I.**, Waldmann, T. A., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: a quantitative CLSM and FRET analysis.
Cytom. Part A. 93 (11), 1106-1117, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.23634>
IF: 3.433
8. Ergülen, E., Bécsi, B., **Csomós, I.**, Fésüs, L., Kanchan, K.: Identification of DNAJA1 as a novel interacting partner and substrate of human transglutaminase 2.
Biochem. J. 473 (21), 3889-3901, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BCJ20160440>
IF: 3.797
9. Csomós, K., Kristóf, E., Márkus, B., **Csomós, I.**, Kovács, G., Rotem, O., Hodrea, J., Bagoly, Z., Muszbek, L., Balajthy, Z., Csősz, É., Fésüs, L.: Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps.
Cell Death Dis. 7 (8), e2332, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.200>
IF: 5.965
10. Kovács, T., Batta, G., Hajdu, T., Nagyné Szabó, Á. T., Váradi, T., Zákány, F., **Csomós, I.**, Szöllősi, J., Nagy, P.: The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency.
Sci. Rep. 6, 35850, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35850>
IF: 4.259





11. Sárvári, A. K., Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., **Csomós, I.**, Balajthy, Z., Fésüs, L.: Interaction of differentiated human adipocytes with macrophages leads to trogocytosis and selective IL-6 secretion.
Cell Death Dis. 6, e1613, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.579>
IF: 5.378

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 54,894

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,627

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

Debrecen, 2022.10.06.



10. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

IL-6 receptor, STAT aktiváció és szerin foszforiláció, sejthalál, áramlási citometria, konfokális mikroszkópia, uveális melanóma, kelidonin

IL-6 receptor, STAT activation and serine phosphorylation, cell death, flow cytometry, confocal microscopy, uveal melanoma, chelidone

11. NYILATKOZAT SAJÁT MUNKÁRÓL

Az értekezésben bemutatott összes ábra saját kísérleteim eredménye. A mikroszkópos WEKA képanalízishez szükséges szegmentálás, valamint az adatok kinyerése Prof. Dr. Nagy Péter segítségével történt, az adatok további feldolgozása és analízise saját munka.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Dóczy-Bodnár Andreának, hogy csatlakozhattam már tudományos diákkörös, később doktorandusz hallgatóként kutatómunkájához. Köszönöm szakmai iránymutatását, hasznos tanácsait, támogatását, valamint tudományos közleményeim és a doktori disszertációm elkészítésében való részvételét és segítségét. Köszönöm Prof. Dr. Mátyus Lászlónak, hogy a Membrándinamikai kutatócsoport vezetőjeként biztosította számomra a kísérletes munkák anyagi és tárgyi feltételeit.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatóinak, Prof. Dr. Panyi Györgynek, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak és Prof. Dr. Damjanovich Sándornak, hogy intézetükben számos modern biofizikai és molekuláris biológiai módszert megismerhettem és elsajátíthattam.

Köszönet jár a munkacsoportunk asszisztenseinek, Utasi-Szabó Rita Katalinnak, Nagy Edinának és Bagosi Adriennek, a sejtek kezelésében és a kísérletes munka összeállításában nyújtott szakmai segítségükért.

Köszönetet mondok a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi munkatársának, különösen Prof. Dr. Nagy Péternek, Dr. Vámosi Györgynek, Dr. Nizsalóczki Enikőnek, Dr. Mocsár Gábornak és Dr. Volkó Juliannának a hasznos szakmai tanácsaikért.

Végezetül köszönöm barátaimnak és családomnak, valamint drága feleségemnek töretlen támogatásukat és szeretetüket.

A disszertáció elkészítését az EU és az Európai Szociális Alap által társfinanszírozott EFOP-3.6.3-VEKOP-16-7-00009 projekt, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal ANN 135107, ANN 133421 és K138075 pályázatai támogatták.

13. FÜGGELÉK
