

Az AXL tirozin kináz inhibitorok hatása a daganatos sejtek migrációjára és rezisztencia mechanizmusaira

Doktori értekezés

Pénzes Kinga

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kéri György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Reményi Attila, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D., adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Klebovich Imre, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Buday László, az MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Budapest

2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1. Bevezetés	10
2.2. A daganatos megbetegedések klasszikus és molekuláris jellemzői.....	12
2.3. A protein kinázok.....	14
2.3.1. A nem receptor tirozin kinázok.....	14
2.3.2 A receptor tirozin kinázok.....	15
2.4. Az AXL tirozin kináz receptor	17
2.4.1. A TAM tirozin kináz család expressziós mintázata és fiziológiás szerepe.....	17
2.4.2. A TAM receptor tirozin kináz receptorok szerkezete	19
2.4.3. A TAM család ligandjai és szerkezetük	19
2.4.4. Az AXL receptor jeltovábbítása.....	21
2.4.5. Az AXL receptor tirozin kináz inaktivációja	24
2.4.6. Az AXL receptor szerepe a daganatokban.....	24
2.4.7. Az AXL szerepe a célzott daganatterápiás szerekkel szembeni rezisztenciában	26
2.4.8. AXL gátló vegyületek	27
3. Célkitűzések.....	30
4. Anyag és módszer	31
4.1. Sejtvonalak.....	31
4.2. Tirozin kináz inhibitorok és monoklonális antitestek.....	32
4.3. Ligandok és Batimastat.....	32
4.4. RNS interferencia, géncsendesítés.....	32

4.5. A sejtproliferáció vizsgálata (CellTiterGlo assay).....	33
4.6. SDS-PAGE és Western blot	33
4.7. Humán foszfo- RTK array, humán RTK chip	34
4.8. Immunoprecipitáció	34
4.9. 3D szferoid kultúra	35
4.10. Sejtmigrációs vizsgálat	35
4.11. Kvantitatív PCR.....	36
4.12. AXL ELISA	36
4.13. NRG1 ELISA.....	37
4.14. AKT foszfo-S473 ELISA	38
4.15. Az adatok kiértékelése és statisztikai analízis	38
5. Eredmények.....	39
5.1. Az AXL receptor tirozin kináz inhibitorok hatása a tripla negatív emlődaganat sejtvonalak migrációjára	39
5.1.1. Az AXL receptor tirozin kináz gátlása függ a sejtípustól és a tirozin kináz inhibitorától.....	39
5.1.2. A tirozin kináz inhibitorok migráció és életképesség gátló hatékonysága sejtípusonként változik.....	41
5.1.3. A vizsgált AXL inhibitorok kináz szelektivitás profilja különbözik	45
5.1.4. A Lyn és a p130 Cas különböző szerepet játszik a tripla negatív sejtvonalak migrációjában és viabilitásában	46
5.1.5. Az MPCD84111 és az SKI606 gátolja a tripla negatív sejtvonalak migrációs jeltovábbítási útvonalait	48
5.2. Az AXL tirozin kináz gátlásának hatásai AXL overexpresszált daganatos sejtvonalak receptor tirozin kináz foszforilációjára és expressziójára	52

5.2.1. Az AXL tirozin kináz gátlása előidézi a HER3 aktivációját és expresszióját	52
5.2.2. A HER3 foszforilációjának az erősödése az alacsony AKT foszfo -S473 mennyiséggel korrelál	56
5.2.3. Az AXL tirozin kináz receptor gátlása aktiválja a HER3 transzkripcióját	59
5.2.4. Az MPCD84111 gátolja a HER3 feedback mechanizmusát.....	62
5.2.5. Az MPCD84111 inhibitor gátolja a HER3 lehetséges dimerizációs partnerét, a HER2 receptort.....	64
5.2.6. A HER3 még a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakban is a HER2-vel dimerizálódik.....	65
5.2.7. NRG1 helyreállítja a sejtek viabilitását és az AKT foszforilációját	69
5.2.8. Az AXL receptor tirozin kináz foszforilációjának a gátlása érzékennyé teszi a sejteket a Lapatinib kezelésre.....	73
6. Megbeszélés	77
7. Következtetések	84
7.1 Az eredmények jelentősége a daganatkutatás és terápia szempontjából	84
8. Összefoglalás.....	86
9. Summary.....	88
10. Irodalomjegyzék.....	89
11. Saját publikációk jegyzéke.....	108
12. Köszönetnyilvánítás.....	109
13. Függelék.....	110
13.1. A megbízott cégek által végzett kísérletek rövid ismertetése	110
13.1.1. Cellular Profiling assay, sejtlapú profiling assay	110
13.1.2. Millipore Kináz Profiler assay	110

13.1.3. Kináz szelektivitás vizsgálat	110
13.2. A megbízott cégek által végzett kísérletek eredményeinek táblázata és ábrái	112

1. Rövidítések jegyzéke

ADAM	A disintegrin and metalloprotease, A diszintegrin és metalloproteáz
ADP	Adenozin diphosphate, adenozin-difoszfát
AKT=PKB	Protein kinase B, protein kináz B
AR	amfiregulin
ATCC	American Type Culture Collection, amerikai típusú sejt kultúra gyűjtemény
ATP	adenozin triphosphate, adenozin-trifoszfát
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, B-sejt lymphoma 2 (fehérje)
Cbl	casitas B-lineage lymphoma, E3 ubikvitin-fehérje ligáz
CDK2	cyclin-dependent kinase 2, ciklin-függő kináz 2
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
Chk1	checkpoint kinase 1, ellenőrzőpont kináz 1
CML	chronic myeloid leukemia, krónikus mieloid leukémia
CSK	c-terminal Src kinase, c-terminális Src kináz
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1, C-X-C motívumú kemokin ligand 1
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2, C-X-C motívumú kemokin ligand 2
DAG	1,2-diacil-glicerol
DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1, diszkoidin domén receptor tirozin kináz 1
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	dimethyl-sufoxide, dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTT	ditiotritol
EGF	epidermal growth factor, epidermális növekedési faktor

EGFR	epidermal growth factor receptor, epidermális növekedési faktor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay, enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat
EMT	epitheliális-mesechymális tranzíció
ER+	estrogen receptor positive, ösztrogén (hormon) receptor pozitív (tumor)
FAK	focal adhesion kinase, fokális adhézíós kináz
FBS=FCS	fetal bovine/calf serum, magzati marha/borjú savó
FDA	Food and Drug Administration, az Egyesült Államok élelmiszer- és gyógyszerügyi igazgatósága
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4, fibroblaszt növekedési faktor receptor 4
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3, fms-rokon tirozin kináz 3
FoxO	forkhead box O, villa alakú transzkripciós faktor O
FP	fluoreszcencia polarizáció
GAS6	growth arrest-specific 6
GnRH	gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin felszabadító hormon
GPCR	G protein-coupled receptor, G fehérje-kapcsolt receptor
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2, növekedési faktor-kötött fehérje 2
HB-EGF	heparint kötő epidermális növekedési faktor
HER2	human epidermal growth factor receptor 2, humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HER3	human epidermal growth factor receptor 3, humán epidermális növekedési faktor receptor 3
HTRF	Homogeneous time-resolved fluorescence
IC₅₀	half maximal inhibitory concentration, a maximális hatás felét kiváltó koncentráció
Ig	immunglobulin

IGFR	insulin-like growth factor receptor, inzulin-szerű növekedési faktor receptor
IHC	immunhisztokémia
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IMAP	immobilized metal ion affinity-based fluorescence polarization, rögzített fémion affinitás-alapú fluoreszcencia polarizáció mérési módszer
INF	interferon
InsR	insulin receptor, inzulin receptor
IKK-β	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta, a kappa-B transzkripciós faktor-inhibitor kináz komplex béta alegysége
IP	immunoprecipitation, immunprecipitáció
IP3	inozitol-trifoszfát
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4, interleukin 1 receptor-kapcsolt kináz 4
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantitation, azonos atomsúlyú jelölési módszer relatív és abszolút fehérje mennyiségi meghatározáshoz
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LG	laminin globuláris „G” (domén)
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogén-aktivált protein kináz
MEK=MAPKK	MAPK kináz
miR-34a	mikro RNS-34a
miR-199a/b	mikro RNS-199a/b
mRNS	hírvivő „messenger” ribonukleinsav
mTOR	mammalian target of Rapamycin, a Rapamycin emlős célpontja
NCBI	National Center for Biotechnology Information, az Egyesült Államok biotechnológiai információs központja

NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, kappa-B transzkripciós faktor komplex (B sejtekben az immunglobulinok kappa könnyű láncának enhancer-e)
NK	natural killer, természetes ölő (sejt)
NRG1=HRG1 β1	neuregulin 1=heregulin 1 β1
PBS	phosphate buffered saline, foszfát pufferelt só (oldat)
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PDGFR-β	platelet-derived growth factor receptor beta, thrombocyta eredetű növekedési faktor receptor béta
Ph+	philadelphia chromosome positive, filadelfia kromoszóma pozitív (tumor)
PI3K	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz,
PKC	protein kináz C
PLC-γ	foszfolipáz C gamma
Plk3	polo-like kinase 3
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride, fenil-metil-szulfonil-fluorid
ProS	protein S
PS	phosphatidylserine, foszfatidil-szerin
PTB	phosphotyrosine binding, foszfortirozin kötő (domén)
PTEN	phosphatase and tensin homologue, foszfatáz és tenzin homológ (fehérje)
Pyk2	proline-rich tyrosine kinase 2, prolinban gazdag tirozin kináz 2
ROS	reactive oxygen species, reaktív oxigén származékok
RTK	receptor tyrosine kinase, receptor tirozin kináz
sAXL	solubil AXL, oldatban lévő (nem membrán kötött) AXL
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SH2	Src homológ domén 2
SHGB	sex hormone-binding globulin, nemi hormont kötő globulin
siRNS	rövid interferáló ribonukleinsav

SILAC	stable isotope labelling by amino acids (in cell culture), stabil izotóp tartalmú aminosavakkal való jelölés (sejtkultúrákban)
SOCS1	suppressor of citokine signaling 1, citokin jelút szupresszor 1
SOCS3	suppressor of citokine signaling 3, citokin jelút szupresszor 3
STAT	signal transducer and activator of transcription, jeltovábbító és transzkripció aktiváló (fehérje)
TGF-α	transforming growth factor alpha, transzformáló növekedési faktor alfa
Tie1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1, immunglobulin és EGF-szerű doménokat tartalmazó tirozin kináz
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor nekrosis faktor
TULP1	Tubby-like protein, Tubby-szerű fehérje
UTR	untranslated region, fehérjeszekvenciát nem kódoló mRNS szakasz
VEGFR	vascular endothelial growth factor, vaszkuláris endothél növekedési faktor

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Bevezetés

Korunk orvostudományának egyik legnagyobb kihívása a tumoros elváltozások gyógyítása. A WHO adatai szerint a regisztrált daganatos betegek száma évről évre növekszik, és 2030-ra várhatóan eléri a 26 milliót. Magyarországon, ahogy a világ többi országában is növekvő tendenciát mutat a megbetegedések gyakorisága és továbbra is a második leggyakoribb halálok.

A daganatok kezelése korábban szinte kizárólag szövettani és képalkotó diagnózis alapján, konvencionális kezelési eszközökkel (kemoterápia, sugárkezelés) történt. Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei alapján azonban nyilvánvalóvá vált, hogy a rosszindulatú daganatsejteket olyan DNS hibák, mutációk hozzák létre, amelyek bizonyos jelátviteli útvonalak túlműködtetése révén hozzájárulnak a daganatsejtek túléléséhez, növekedéséhez és terjedéséhez. A szövettani szempontból egymáshoz hasonló daganatok mutációs háttere azonban betegenként eltérő. Ezért visszaszorításukhoz valójában minden esetben más-más célpont(ok) gátlása lenne kívánatos, ellentétben a minden osztódó sejtet pusztító kemoterápiákkal. Ezt nevezzük személyre szabott, célzott daganatterápiának: a rosszindulatú daganatsejtek növekedéséért, túléléséért és terjedéséért felelős hibás gének (un. onkogének) beazonosítása a betegben és az általuk kódolt hibásan működő fehérjék szelektív gátlása. Így a betegségeket a konkrét molekuláris elváltozás szintjén kezelhetjük, ami nagyobb hatékonyságot eredményez a mellékhatások drasztikus csökkenése mellett. Ez az új megközelítés ugyanakkor komplex molekuláris diagnosztikát igényel. Számos potenciális célpont közül ezidáig a protein kinázok bizonyultak a legmegfelelőbbnek, mivel közülük sokan meghatározó részvevői a hibás jelátviteli utaknak. Innét származik a jeltovábbítási terápia elnevezés. Jelenleg az FDA által törzskönyvezett monoklonális antitestek és kis molekulásúlyú kinázgátlók többsége receptor tirozin-kináz gátló.

A személyre szabott, célzott jeltovábbítási terápiának két hátulütője van: egyrészt egy adott szerre mindig csak a betegek egy kisebb része reagál, mint a hagyományos radio- vagy

kemoterápiáknál, attól függően, hogy hányan hordozzák azt az onkogént, amin a gyógyszer hat. Ez például az imatinib esetében, CML betegekben eléri a 85 %-ot [1], míg az erlotinib esetében nem kissejtes tüdődaganatos betegekben mindössze 12,3% [2]. Másrészt a kezdeti drámai javulás után gyakran következik be visszaesés, mivel újabb onkogének aktiválódása révén a daganat pótolni képes a legátolt molekula hatását. Ez a másodlagos (szerzett) rezisztencia.

Ezen kívül a legtöbb célzott hatású szer csak a tumorsejtek túlélését csökkenti, migrációs képességüket nem. Pedig a rosszindulatú daganatok valódi ismérve, hogy a szöveti mátrix és a sejt-sejt kapcsoló struktúrák lebontása révén képesek kiszakadni eredeti környezetükből, a véráram útján más szervekbe migrálni és ott metasztatizist –áttétet képezni. A migrációs folyamatokban és a velük kapcsolatban álló jelátviteli útvonalakban szintén sok kináz található, melyek így potenciális célpontjai egy anitmetasztatikus kezelésnek.

Doktori munkám során egy, az első vonalban adott kinázgátlókkal szembeni másodlagos rezisztencia kialakulásában fontos, ám még kevésbé felderített onkogén, az AXL receptor tirozin-kináz hatásait és gátlásának lehetőségeit vizsgáltam.

2.2. A daganatos megbetegedések klasszikus és molekuláris jellemzői

Szöveti eredetük alapján a daganatok laphám (ezek a karcinómák), festékes (melanomák) mirigyház, éreredetű (angioszarkóma), kötőszöveti (sarcomák), nyirokrendszerből (limfómák) és vérképző (leukémiák) rendszerből kiindulók lehetnek. Súlyosságuk szerint pedig jóindulatú (benignus) és rosszindulatú (malignus) elváltozásokat különböztetünk meg. A benignus daganatok nem képeznek áttétet, nem okoznak súlyos szervi zavart, általában jól műthetőek és nem újulnak ki. A malignus daganatok már súlyos működési zavarokat okoznak abban a szervben, amiben kifejlődnek, a bazális membrán áttörésével pedig áttéteket, metasztázisokat képezhetnek (sokszor már a diagnosztizálás időpontjában szóródtak), nehezen, vagy egyáltalán nem műthetőek (például a nem-kis sejtes tüdőkarzinóma), és nagy valószínűséggel kiújulnak a kezelést követően.

A rosszindulatú daganatok metasztázisra való hajlama -azaz a daganatsejtek migrációs képessége- agresszivitásuk egyik markere. A daganatterápia egyik fontos kihívása tehát, hogy megakadályozza a daganat sejtek migrációját.

A rosszindulatú daganatokat a mai napig használt klinikai osztályozás szerint négy stádiumba soroljuk. Az első stádiumú daganatok mérete nagyon kicsi és még nem metasztatizáltak. A második stádiumú daganatra jellemző, hogy -a legtöbb esetben- az első stádiumú daganathoz képest sokkal nagyobb méretű és már átterjedt a közeli nyirokcsomókra, illetve a közelben lévő szervekre vagy szövetekre. A harmadik stádiumú daganatok mérete elég nagy, és már a távolabbi nyirokcsomókra és szervekre vagy szövetekre is átterjedt. A negyedik stádiumú primer daganat mérete tovább nőhet, és az áttétek átterjednek a szervezet más területeire is.

A betegek túlélési esélye a legjobb az első és második stádiumú daganatoknál, míg a legrosszabb a harmadik és a negyedik stádiumú daganatoknál.

Pusztai szövettani analízissel a rosszindulatú daganat eredetére és metasztázisra való hajlamára is következtethetünk. További prognosztikus és terápiás információval szolgál a klasszikus IHC vizsgálat, ugyanis bizonyos markerek jelenlétéből/elhelyezkedéséből

szintén következtetni lehet az adott daganat agresszivitására és az alkalmazandó terápia fajtájára. Az emlődaganat kezelését a mai napig is ezekkel a módszerekkel határozzák meg. Hiszen ismert, hogy az emlődaganat sejtek különböző receptorokat expresszálnak, ami befolyásolja a daganat terápiáját és a terápiára adott válaszát. A receptorok expressziója alapján az emlődaganatokat négy kategóriába sorolják: **Luminális A**: lassan növekvő daganat progeszteron- és ösztrogénreceptor pozitív, **Luminális B**: gyorsan növekvő daganat a progeszteron- és ösztrogénreceptorokra is pozitív, emellett HER2-negatív, **HER2 pozitív**: HER2 fehérje amplifikált, veszélyesebb a luminális típusoknál, **Tripla negatív**: negatív a progeszteron- és ösztrogénreceptorokra, valamint a HER2-re is.

Az emlődaganatos esetek körülbelül 10-20%-a tripla negatív emlődaganat. Ezekre a daganatokra jellemző, hogy elég heterogének és agresszívek, hiszen a radikális műtétet követően a távoli áttétképződés -főképpen a tüdőre és agyra, ritkábban májra, csontkockázata nagyon magas [3]. Mivel ezek a daganatok az endokrin terápiára és Herceptin (HER2 gátló antitest) kezelésre nem reagálnak, jelenleg a kemoterápia jelenti az egyedüli kezelési lehetőséget.

A humán genom felderítése és a PCR-es technológiák fejlődése új irányt adott a daganatok megismerésének is. A nehezkesebb fehérje alapú karakterizálásnál (IHC, Western blot) sokkal több információt nyerhetünk a daganatok genom és transzkriptom elemzéséből. Kiderült, hogy a daganatos elváltozásokat DNS vagy fehérje szintű hibák és a hatásukra túlműködő jelátviteli útvonalak „hajtják”. A Vogelstein-féle onkogén modell szerint meglepően kevés, mintegy 140 gén mutációja, epigenetikus csendesítése, illetve fehérje termékeik overexpressziója képes tumorgenézist indukálni és fenntartani. Ezek a gének 12 jeltovábbítási útvonalban résztvevő fehérjéket kódolnak, főként kinázokat és transzkripciós faktorokat. Egy tipikus tumor a kialakulása során körülbelül kettő-nyolc ilyen „hajtó” gén hibáját halmozza fel, amelyek általában más-más jeltovábbítási útvonalban helyezkednek el [4]. A daganatok függnnek is ezektől a túlműködő jelpályáktól, hiszen gátlásuk a tumor látványos visszaszorulását eredményezi. A betegek jelentős részében viszont idővel újabb hiba jelentkezik a legátolt útvonal valamely más fehérjében, ami visszaállítja a jelpálya túlműködését. Ez a célzott terápiákkal szemben kialakuló másodlagos rezisztencia.

2.3. A protein kinázok

A jeltovábbításban részt vevő fehérjék többsége protein kináz, amelyek katalitikus doménjük alapján foszforilálhatnak tirozint vagy szerint/threonint [5]. Lehetnek membrán kötöttek, vagy citoszolikusak, bár ez utóbbiak is kihorgonyozódhatnak membránokhoz. Fontos szerepet töltenek be a túlélés, migráció, növekedés, adhézió, anyagcsere és sejt differenciálódás szabályozásában. Rendellenes működésük rosszindulatú daganatok, cukorbetegség, gyulladás, arteroszklerózis és angiogenezis kialakuláshoz vezethetnek.

2.3.1. A nem receptor tirozin kinázok

A nem receptor tirozin kinázok a citoplazmában vagy a sejtmagban helyezkednek el, a sejtmembrán belső felszínéhez sejtadhéziós molekulák révén kapcsolódnak. A nem receptor tirozin kinázokat növekedési faktorok, neurotranszmitterek, citokinek és hormonok stimulálhatják. Aktivációjukat követően, SH doménjükön keresztül számos más fehérjével lépnek kapcsolatban, ezáltal többféle jeltovábbítási útvonalat (PI3K/AKT, MAPK, PLC γ , lásd 2.4.4.1-2.2.4.3 fejezeteket) aktiválhatnak.

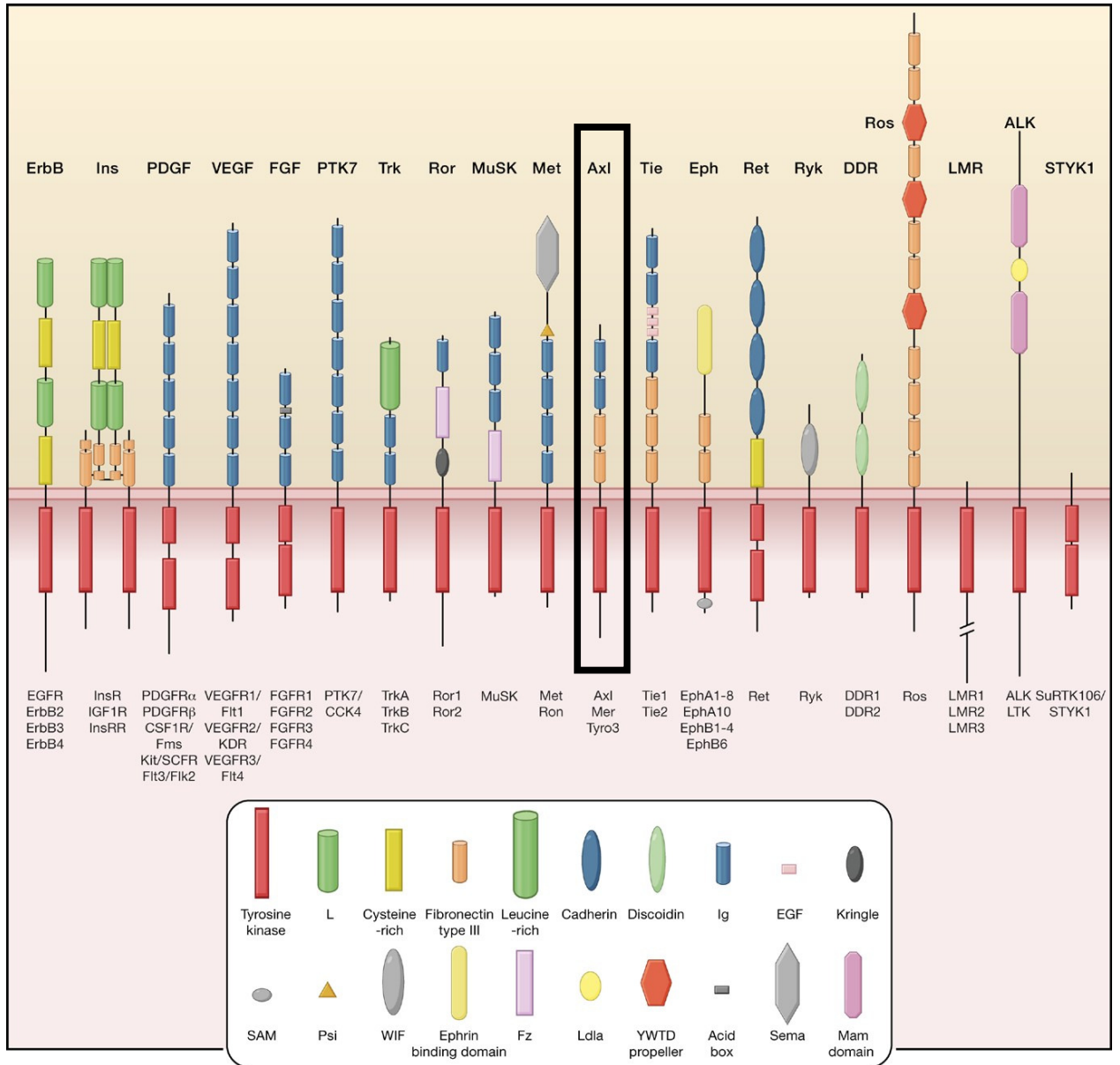
A nem receptor tirozin kinázok közé tartozik a FAK, Fes, ABL, Csk, JAK, Tec, Src és a Syk család. A Src család tagjai (Src, Lck, Fyn, Yes, Hck, Blk, Fgr, Lyn, Srm, Frk és Yrk), különböző jelútvonalakban működve szabályozzák a sejtek homeosztázisát, növekedését és migrációját. A Src család tagjainak expressziója sejt típusonként eltér: a Src, Yes és Fyn majdnem minden szövetben megtalálható, a Srm a keratinocitákban, míg a Blk, Hck, Lck, Fgr és a Lyn. főképpen a hemopoetikus sejtekben expresszálódik [6]. Közös jellemzőjük, hogy az N terminális részhez kötődő mirisztril csoport révén kapcsolódnak a membránhoz, míg a palmitoil csoport a sejtben történő mozgásukhoz szükséges [7]. Számos receptor tirozin kinázzal (EGFR, Met, AXL) és nem receptor tirozin kinázzal, például a FAK-al is kapcsolatba lépnek [7]. A FAK a fokális adhéziók révén pedig kapcsolatban kerülhet a mátrixreceptorok egyik csoportjával, az integrinokkal. Az integrinek mellett a sejt-sejt és sejt-környezet közötti kapcsolat szabályzásában fontos szerepet játszanak még a nem

integrin típusú mátrixreceptorok, a nem specifikus mátrixreceptorok, és a mátrix metalloproteázok (MMP2, MMP9) is. Mivel az integrinek nem rendelkeznek citoplazmatikus tirozin kináz aktivitással, ezért jelátvitelük az aktinkötő fehérjék (talin vagy paxilin) révén valósul meg [8]. A FAK ezekhez az aktinkötő fehérjékhez kötődve aktiválódik [9]. A Y925, Y576 és Y577 tirozin oldalláncok kötődési helyet jelentenek a Src család tagjai (Lyn, Src, Fyn) számára [10, 11]. A FAK két prolinban gazdag régiójához a p130Cas állványfehérje is kötődhet, amely így ugyanúgy mint FAK, fontos szerepet tölt be a sejtek migrációjában [12]. A FAK-hoz hasonló stukturával rendelkezik még a Pyk2 kináz, amely bizonyos sejt típusokban a fokális adhéziós komplex egyik résztvevője [13]. A Pyk2 kináz a fontos foszforilációs helyeit (Y402, Y580) a Src kináz is foszforilálja [14]. A sejtek migrációját a p130Cas asszociációja révén is befolyásolhatja [15].

2.3.2 A receptor tirozin kinázok

Az eddig ismert 530 protein kináz génből 90 gén kódol tirozin kinázt amiből 58 tartozik a receptor tirozin kinázok csoportjába, amelyeket kináz doménjük aminosav szekvenciája és az extracelluláris régió strukturális hasonlósága alapján 20 családba sorolnak (1-es ábra) [5]. Szerkezetükre jellemző, hogy rendelkeznek egy extracelluláris ligandkötő, egy transzmembrán és egy intracelluláris kináz doménnel. Az extracelluláris rész tartalmazza a ligand kötő helyet. Szerkezete családonként eltérő típusú doménekből (immunoglobulin szerű, prolinban vagy leucinban gazdag, ciszteinben gazdag, EGF-szerű) áll. Az extracelluláris részt egy junxtamembrán régió köti össze az intracelluláris kináz doménnel. A receptor tirozin kináz családok intracelluláris katalitikus doménje körülbelül 250 aminosavból áll, melynek szekvenciája és három dimenziós szerkezete evolúciósan igen konzervált. Ez a domén egy kisebb β -redő szerkezetű C-terminális és egy nagyobb α -hélix szerkezetű N-terminális részből áll. A tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptorok aktiválódása az extracelluláris részhez kötődő ligand hatására történik meg, aminek következtében két receptor tirozin kináz egy dimert alkot [16]. A dimerizáció miatt közel kerülnek a katalikus kináz domének is, és keresztbe foszforilálják egymás meghatározott

tirozinjait. A foszforilált oldalláncokhoz SH2 vagy PTB domént tartalmazó molekulák képesek kötődni, amelyek ezután különböző jelátviteli útvonalakat aktiválnak.



1. ábra. A receptor tirozin kinázok családjai és szerkezetük. Forrás: [17]

2.4. Az AXL tirozin kináz receptor

2.4.1. A TAM tirozin kináz család expressziós mintázata és fiziológias szerepe

A TAM receptor tirozin kináz családnak három tagja ismert: az AXL (Ark, Tyro7, Ufo), a Mer (Eyk, Nyk, Tyro12) és a Tyro3 (Byk, Dtk, Rse, Sky, Tif). Mindhárom receptorra jellemző, hogy főképpen az immun-, vaszkuláris-, reprodukív- és az idegrendszer sejtjein expresszálódnak, ahol számos folyamat szabályozásában vesznek részt [18].

Az AXL minden szövetben jelen van, de a hippocampusban, a kisagyban, a szívben, a makrofágokban, a harántcsíkolt izomszövetben, a májban, a vesékben, a herékben és az endothél sejtekben magasabb az expressziója.

A Mer elsősorban a hematopoetikus sejtekben (makrofágok, dendritikus sejtek, NK sejtek, megakarociták) expresszálódik, de megtaláljuk a petefészkekben, a prosztatában, a herékben, a tüdőben, a retinában és a vesékben is [19-21]. A szív, az agy és a vázizom szöveteiben is jelen van, de alacsonyán expresszált [21].

A Tyro 3, hasonlóan a Mer-hez, számos hematopoetikus sejtben, a herékben, a petefészkekben, az emlőkben, a tüdőben, a vesékben, a retinában és az oszteoklasztokban is megtalálható, de nagyobb mennyiségben csak az idegrendszerben expresszálódik [19, 22, 23].

Habár az TAM receptorok mRNS-e megtalálható az embrionális szövetekben, hiányuk nem okoz semmilyen változást az embrionális fejlődésben. Ezzel ellentétben a felnőtt szervezetben a TAM receptorok fontos szerepet töltenek be a szöveti regeneráció során [24].

Nagyon sokáig azt hitték, hogy a TAM receptorok sejtípustól függően egyedi funkciókkal rendelkeznek, de a legutóbbi vizsgálatok egyre inkább arra mutatnak, hogy a TAM receptorok funkciója hasonló és kooperatív [25].

Ligand-receptor kombinációtól, sejtípustól és a környezettől függően a TAM receptorok különböző sejtválaszt adhatnak.

Az immunsejtekben elsősorban az apoptotikus sejtek fagocitózist és citokin szekrécióját szabályozzák [26, 27].

Az apoptotikus sejtek eltakarítása fontos szerepet tölt be a szöveti fejlődésben, homeosztázisban, a limfociták érésében és a gyulladásos folyamatokban, mivel az apoptotizált sejtek felhalmozódása szöveti nekrozishoz vezetne. Az immunsejtek közül elsősorban a makrofágok azok, amelyek felismerik a foszfátidil szerint membránjuk külső felszínére fordító apoptotikus sejteket és fagocitálják azokat [28]. E felismerés direkt módon a makrofágok PS receptorán keresztül, vagy indirekt módon egyes szolúbilis fehérjék (például a TAM receptorok ligandjai: Gas6 és ProS) révén történik. Ebben a folyamatban nem csak a Gas6 és a ProS, de maguk a TAM receptorok is fontos szerepet töltenek be. Megfigyelték, hogy a makrofágokban amelyek mind a három TAM receptort expresszálják [21, 22, 29] elsősorban a Mer receptor, míg a dendritikus sejtekben AXL és Tyro3 receptorok vesznek részt az apoptotikus sejtek eltakarításában [20].

A veleszületett immunrendszer sejtjeiben a TAM család tagjai szabályozzák a citokin szekréciót úgy, hogy csökkentik a proinflammatorikus citokinek (TNF, IL-6 IFN) termelését a citokin jelátvitelt szupresszáló fehérjék (SOCS1, SOCS3), aktivációja révén [30]. Éppen ezért az AXL, a Mer és a Tyro3 receptorok hiánya elősegíti a krónikus autoimmun betegségek, mint például a reumatoid arthritis vagy a szisztémás lupus erythematosus megjelenését [31, 32]. A TAM receptorok szabályozzák az NK sejtek differenciációját és érését [33], továbbá fontos szerepet játszanak a trombociták aggregációjában [19]. Legutóbbi vizsgálatok rámutattak, hogy a TAM receptorok hiánya vagy a szolúbilis AXL vagy Mer gátolja a trombózt illetve trombocita funkció kiesést okoz [34].

Eleinte a TAM receptorok funkcióját főképpen az ér sima izom sejtjein vizsgálták, ezért már nagyon korán nyilvánvalóvá vált, hogy az AXL, Mer és Tyro3 receptorok fontos szerepet játszanak az arteroszklerózis kialakulásában [35, 36]. Érsérülés során az ér simaizom sejtjeiben az AXL és a Gas6 expressziója megnövekszik, de az AXL aktivációja indukálja e sejtek migrációját is, továbbá megvédi őket az apoptozistól és a kalcium szint növekedésétől [35, 37]. Hasonló antiapoptotikus mechanizmust figyeltek meg az endothél sejtekben is [38].

2.4.2. A TAM receptor tirozin kináz receptorok szerkezete

A TAM család tagjai hasonlóan a többi RTK-khoz, rendelkeznek egy ligandkötő extracelluláris, egy transzmembrán és egy konzervált intracelluláris kináz doménnel. Extracelluláris doménjükre jellemző egy adhéziós molekula-szerű domén amely egy kettős immunoglobulin-kapcsolt doménből és két III-as típusú fibronektin ismétlődésből áll (2-es ábra) [25]. Az ismert RTK közül egyedül a Tie1 és a Tek (Tie2) tirozin kinázok extracelluláris doménjére jellemző még ez a szerkezet [39]

A TAM receptorok kináz doménjére egy egyedülálló konzervált KW(I/L)A(I/L)ES aminosavszekvencia jellemző, melynek hasonlósága alapján közeli rokonságban állnak a Met tirozin kináz családdal (2-es ábra) [40]. A sejten belüli hatásuk is hasonló, hiszen a Met és a TAM receptorok hasonló jelútvonalakat aktiválnak [41, 42].

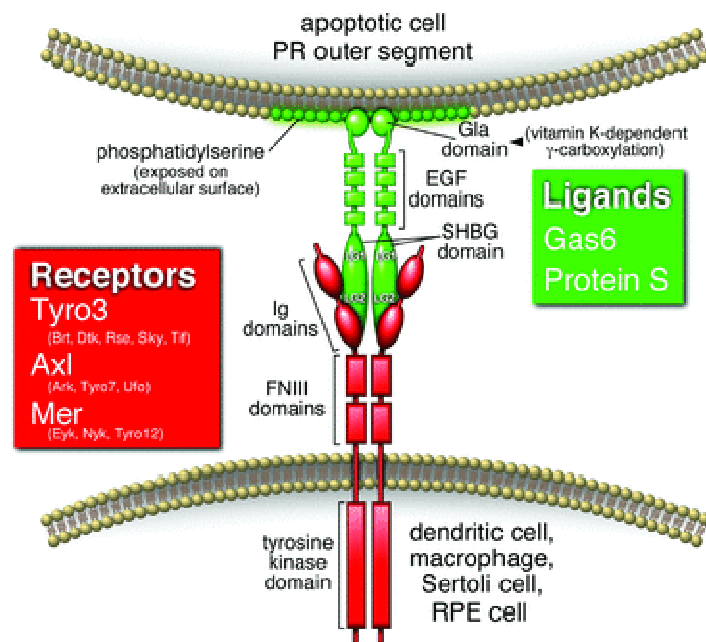
A TAM receptor család tagjai közül az AXL és a Mer a kináz domén aminosav szekvenciájában [21], míg az AXL és a Tyro3 az exonok száma és struktúrája alapján mutat homológiát [24, 43].

2.4.3. A TAM család ligandjai és szerkezetük

A TAM család tagjainak a ligandja sokáig ismeretlen volt, míg 1995-ben felfedezték, hogy a K vitamin-függő Gas6 képes aktiválni az AXL tirozin kináz receptort [44], míg a ProS a Tyro3 tirozin kináz receptort aktiválja [45, 46]. Később sikerült kimutatni, hogy a Gas6 különböző affinitással mind a három receptorhoz kötődik és aktiválja is azokat [47-49]. Habár nagyon sokáig azt hitték, hogy a ProS csak a Tyro3-hoz kötődik, nemrég sikerült bebizonyítani, hogy azokban a sejtekben ahol a Mer és a Tyro3 együtt expresszálódik, ott a ProS a Mer receptorhoz is képes kapcsolódni [50].

Szerkezetüket tekintve a Gas6 és a ProS aminosav szekvenciája 43%-ban azonos, de a Gas6-ból hiányzik a trombin hasító régió [51]. Az N-terminális végükön mindkét fehérje tartalmaz egy körülbelül 60 aminosavból álló glutaminsavban gazdag Gla domént amely a K vitamin-függő reakció során γ - karboxilálódik [52]. Fontos, hogy ez a karboxiláció azelőtt

történjen meg mielőtt a Gas6 és ProS biológiailag aktívvá válna [53]. E két ligand a Gla doménon keresztül képes kötődni az extracelluláris PS-ekhez, ami fontos szerepet tölt be a TAM receptor-mediált fagocitózisban [54]. A Gla domént négy EGF-szerű ismétlődés és két gömb alakú „LG” domén követi, utóbbiak az SHBG-k és a lamininek G doménjeihez hasonlóak (2-es ábra) [48]. Ezek az SHBG domének fontos szerepet játszanak a TAM receptorok aktivációjában [55]. Nagyon sokáig nem volt világos, hogy a két LG domén közül melyik aktiválja az AXL receptort. Nemrég krisztallizációs vizsgálatokkal sikerült kimutatni, hogy a két domén közül LG1-es domén felelős az AXL receptor aktivációjáért. Az LG1-es az AXL receptor két Ig doménjéhez kötődve aktiválja a receptort [55].



2. ábra. A TAM receptoroknak és a ProS, Gas6 ligandok szerkezete

A dimerizált TAM receptor a ProS vagy Gas6 ligandokhoz kötődik. A ligandok Gla doménjének az N terminális vége az apoptotikus sejtek foszfatidilszerinjéhez kötődik. A ligand aktivitásához szükséges a Gla domén glutaminsavjának a γ -karboxilációja, amely a K vitamin jelenlétében zajlik. Forrás: [27]

Nemrég 3 új TAM receptor ligandot azonosítottak, a Tubby-t, a TULP1-et és a Galectin-3-at [56]. A Tubby és a TULP1 ligandokra jellemző, hogy hiányzik belőlük a Gas6 és ProS ligandokra jellemző SHBG domén [57]. Ehelyett az N-terminális végükön elhelyezkedő MPD rézion keresztül kapcsolódnak a TAM receptorokhoz [57]. Míg a TULP1 mindhárom

receptorhoz, addig a Tubby csak a Mer receptor kötődik. Mindkét ligand fontos szerepet tölt be a fagocitózis során azáltal, hogy hidat képeznek a makrofágokon elhelyezkedő TAM receptorok és a fagocitálendő apoptotikus sejtek között [57]. A Galectin-3, a Tubby és a TULP1 ligandokhoz hasonlóan az apoptotikus sejtek és törmelékek fagocitálásában játszik szerepet. Jelenleg nem ismert, hogy pontosan melyik doménjén keresztül kapcsolódik a Mer receptorhoz [58].

2.4.4. Az AXL receptor jeltovábbítása

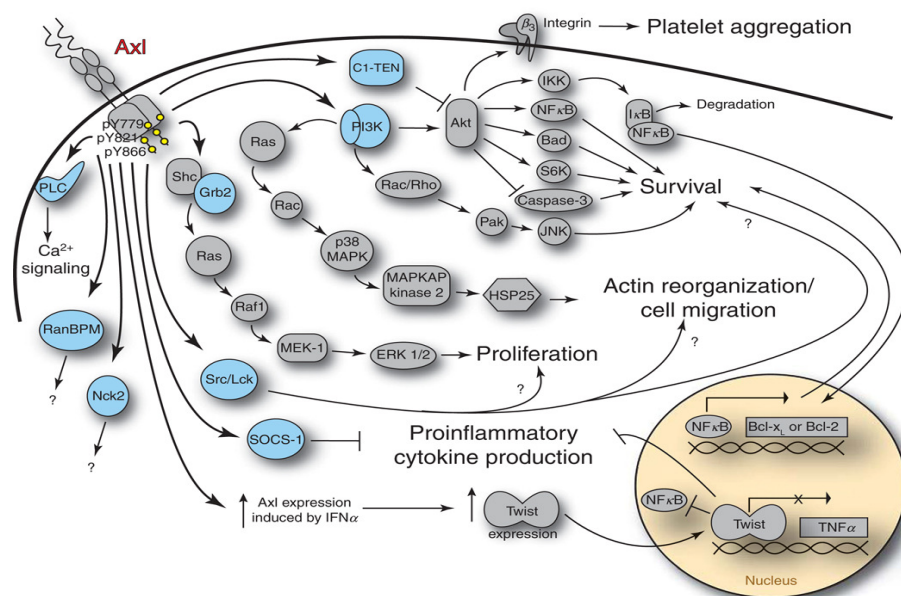
Az AXL (Ark, Ufo) tirozin kináz receptort eredetileg két CML-es betegből azonosították 1988-ban. Az AXL név a görög *anexelegto* szóból származik, melynek jelentése „ellenőrizhetetlen“. A humán AXL receptor génje a 19-es kromoszómák q13.1-q13.2 régióiban lokalizálódik és 20 exonból áll, melyek egy 894 aminosavból álló fehérjét kódolnak [59]. Fiziológiásan az AXL receptor a vese, a máj, a szív, a herék sejtjeiben, továbbá monocitákban és makrofágokban expresszálódik [21, 60-62] ahol többek között ezeknek a sejteknek a proliferációját, túlélését és migrációját szabályozza. Továbbá az AXL a másik két TAM receptorral együtt részt vesz az apoptotikus sejtek eltakarításában, a hímivarsejtek érésében, a vaszkuláris simaizom homeosztázisában, az eritropoézisben és az immunválaszban [24, 61].

A TAM család tagjai más családokhoz tartozó receptor tirozin kinázhoz hasonlóan ligankötés hatására aktiválódnak. A Gas6 nagy affinitással képes kötődni az AXL receptor immunoglobulin doménjéhez ami kiváltja a receptor dimerizációját és autofoszforilációját három tirozin oldalláncon: Y779, Y821 és Y866 [63]. Ismert a ligand független aktiváció is, amikor két szomszédos sejten overexpresszált AXL receptor extracelluláris része összekapcsolódik, ami a sejtek aggregációját okozza [64]. Ezekon kívül az erek simaizom sejtjeiben a reaktív oxigén gyökök (ROS) is képesek aktiválni az AXL receptort [65].

A receptor intracelluláris doménjének foszforilált tirozinjaihoz az azokat felismerő SH2 vagy foszfortirozin doménnel rendelkező molekulák kapcsolódhatnak. A foszfo Y779-hez a PI3K, a foszfo Y821-hez a c-SRC, az Lck és a Grb2 míg a foszfo Y866-hoz a PLC- γ

kapcsolódik. Ismertek más kötő molekulák is, mint például az Nck2 adaptor fehérje, a SOCS1 cytokin jeltovábbítás szupresszor fehérje, a C1-TEN foszfatáz, a Ran-kötő fehérje, a c-Src, az Lck, a Lyn és a Tensin2 fokál adhéziós molekula [66, 67].

Az AXL receptorból három fő jelátviteli útvonal indul ki: a MAPK, a PI3K/AKT és a PLC- γ /PKC (3-as ábra), amelyek a sejtek növekedését és túlélését serkentik. A sejtek proliferációjáért főképpen a MAPK jelút, míg a sejtek túléléséért a PI3K/AKT jelút aktiválódása felelős. Ez alól kivételt képeznek az ér simaizom sejtjei, a GnRH-t szekretáló idegsejtek és az oligodendrociták, amelyekben a Gas6 és az AXL a PI3K-AKT útvonaltól független jeltovábbítási útvonalak aktiválásával szabályozzák a sejtek túlélését [35, 68, 69].



3. ábra. Az AXL receptor jeltovábbítási útvonalai. Forrás: [25]

2.4.4.1. A MAPK útvonal

A mitogén-aktivált protein kináz jelút evolúciósan konzervált, amely más jeltovábbítási útvonalakkal együttműködve képes befolyásolni a sejtek növekedését, differenciációját, a gyulladási és az apoptotikus folyamatokat. Ehhez a kaszkárendszerhez olyan

szerin/treonin kinázok tartoznak, amelyek csak az utánuk következő kinázt aktiválják. A három legfontosabb MAPK jelút vonal a p38, a JNK és az ERK. A p38 és a JNK útvonalnak kiemelt szerepe van a stresszre és gyulladásos citokinekre adott sejt válaszában, míg az ERK útvonal a proliferációs és differenciációs folyamatokban vesz részt.

Az AXL kinázhoz kapcsolódó MAPK jelút aktivációja a Grb2 adapter fehérjén keresztül valósul meg [66]. Ez a kapcsolódás direkt módon a foszfo-Y821-en keresztül vagy indirekt módon a ligand stimuláció által foszforilált Shc fehérjén keresztül történhet meg. Ez a kapcsolódás teszi lehetővé, hogy az AXL a Grb2 fehérjén keresztül mind a három legfontosabb MAPK jelút vonalat (p38, JNK és ERK) aktiválja. Az AXL receptor ezeken a jelút vonalokon keresztül képes stimulálni a sejtnövekedést és az aktin citoskeleton újrendeződését, ez utóbbit főképpen a p38-as jelút vonal által szabályozza [53]. NIH3T3 sejtekben ez utóbbi útvonal nélkülözhetetlen a Gas6/AXL által indukált mitogenezisben [70].

2.4.4.2. A PI3K/AKT jelút vonal

Ez a jelút vonal a MAPK-hoz hasonlóan szintén fontos szerepet játszik a sejtnövekedés fenntartásában, de fő hatásmechanizmusa a sejtek túlélésének, differenciációjának és migrációjának a stimulálása.

Az AXL által aktivált AKT jelút gátolja az apoptózist, ezáltal elősegítve a sejtek túlélését. Ezt a hatást különbözőképpen képes kifejteni: foszforilálja az S6K kinázt, a Bcl-2 antiapoptotikus fehérjét és serkenti az NF κ B jelút vonalat, míg a kaszpáz 3, proapoptotikus fehérje aktivációját gátolja [70-72].

2.4.4.3. A PLC γ útvonal

A PLC- γ az SH2 doménjén keresztül kötődik az AXL receptor foszfo-Y821 és foszfo-Y866-hoz. Az aktivált PLC- γ a foszfatidil-inozitol-4,5-bifoszfátot bontja DAG-á és IP3-á. A DAG aktiválja a klasszikus és új típusú PKC kinázokat, míg az IP3 specifikus

receptorokon keresztül az endoplazmás retikulumból szabadít fel Ca^{2+} -ot. A Ca^{2+} kalmodulinhoz való kötődése számos jelút vonalat aktivál.

A fentiekben részletezett jelút vonalakon kívül a Gas6/AXL tengely gátolja még az öröklött immunrendszer sejtjeiben a TLR és a citokin receptorok jeltovábbítását, míg az SHP-2 aktivációja révén a VEGFR2 aktivációját is [30, 73, 74].

2.4.5. Az AXL receptor tirozin kináz inaktivációja

AXL receptor inaktivációjáról ez idáig kevés információnk van. Az egyik feltételezett mechanizmus a proteolitikus hasítás, melynek során a receptor extracelluláris része eltávolításra kerül. Az így keletkezett szolúbilis AXL (sAXL) a szérumban képes megkötni a Gas6-ot, ezzel meggátolva a membránban lévő AXL receptorok aktivációját [75]. A proteolitikus hasítást valószínűleg egy metalloproteináz enzim az ADAM17 végzi [76]. A klasszikus RTK-okra jellemző inaktivációt, az internalizációt, az AXL kináz esetében is megfigyelték [69]. Ennek során a receptorok egy klatrinnal bélelt membránbefűződésbe kerülnek és endocitózissal internalizálódnak. Az így létrejött korai endoszomákban a receptorokat a Cbl ubikvitin-fehérje ligáz ubikvitinálja, ami proteaszómális degradációjukhoz vezet.

2.4.6. Az AXL receptor szerepe a daganatokban

Az AXL receptor szerepe a humán daganatok pathogenézisében már régóta ismert, hiszen génjét eredetileg humán rákos sejtekből klónozták [60]. Az AXL overexpresszióját számos daganatfélében kimutatták, mint például pajzsmirigy- [77], emlő- [78], vastagbél- [79], tüdő- [80], máj- [81], leukémia- [62], nyelvcsőtumorokban [82] és aszterocitaszerű gliomákban [83]. AXL overexpressziója egyaránt megfigyelhető az emlődaganatos betegek mintáiban és humán emlődaganatos sejt vonalakban. Számos irodalmi adat igazolja, hogy AXL overexpressziója elsősorban a metasztázisos emlődaganatokban fordul elő, tehát az alacsony túlélés egyik indikátora [84]. Húgyhólyag daganatokban például a Fra-1

transzkripció faktor szabályozza az AXL receptor expresszióját az *AXL* gén promoteréhez kötődve [85]. Ezen kívül az *AXL* gén promoter aktivációja és így az AXL fehérje expressziója függ a promoter CpG szigeteinek metiláltságától is, befolyásolva a sejtciklust, a tumor fejlődését és differenciálódását [86-88]. Az AXL expresszióját a miR-34a és az miR-199a/b miRNS-ek is befolyásolják azáltal, hogy kötődnek az AXL mRNS 3'-UTR régiójához [89]. Vastagbél-, nem kissejtes tüdő- és emlődaganat sejtvonalakban például a miR-34a gátolja az AXL fehérje expresszióját [89]. Transzformáló képességének a háttérben a kináz expressziójában bekövetkező változások állnak, melyek fokozzák a rákos sejtek proliferációját, migrációját, aggregációját és túlélését. Az AXL onkogén potenciálját elsősorban a fentiekben részletezett antiapoptotikus és proliferációs útvonalak aktivációjának köszönheti. Ugyanakkor a proinflammatorikus citokinek (IL-8, CXCL1, CXCL2) aktivációja révén képes szabályozni a tumor és a stróma közötti interakciókat is [90]. Ezek a citokinek az adéziós molekulák és a metalloproteázok stimulációja révén befolyásolják a tumor sejtek invázióját és migrációját. Az AXL expressziója tehát fontos szerepet tölt be az EMT fenntartásában, amely a daganatsejtek metasztatizálását segíti elő [91, 92].

AXL overexpressziója csökkenti az emlő glioblasztóma, tüdő, petefészek, vese és akut mieloid leukémiás betegek túlélését [84, 93-96].

Ezekben a sejtekben AXL fontos szerepet tölt be az EMT és a sejtek metasztatizálásának a szabályozásában [97, 98]. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy ER+ betegek mintáiban az AXL overexpresszió gyakran előfordul, de ezidáig nem sikerült kimutatni az ösztrogén receptor kötődését az AXL gén promoteréhez. Viszont ezekben a sejtekben a Gas6 expressziója az ösztrogén receptor által szabályozott [99].

2.4.7. Az AXL szerepe a célzott daganatterápiás szerekkel szembeni rezisztenciában

Az elmúlt években rohamosan nőtt az olyan daganatterápiás szereknek a száma, amelyek olyan molekulákat gátolnak, amelyek fontos szerepet töltenek be a daganatok viselkedésében. A potenciális célpontok közül kiemelkedő szerephez jutottak az EGFR család tagjai, mivel a leggyakoribb daganatokban ezek a receptorok járulnak hozzá a daganatsejtek növekedéséhez és a tumoros transzformációjához: például nem-kis sejtes tüdőkarinómák, fej-nyaki daganatok, emlődaganatok esetében [100-102]. Az EGFR családnak négy tagja ismert: ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) és ErbB4 (HER4). Habár mind a négy receptor tirozin kináz receptorként közismert, a HER3 nem rendelkezik kináz aktivitással. Éppen ezért a HER3 csak heterodimér szerkezetben tud aktiválódni. Elsődlegesen a HER2-vel dimerizálódik, de számos esetben az EGFR-el is képez heterodimért. Habár a HER2-nek nincs ismert természetes ligandja, a többi EGFR család tagjainak elsődleges dimerizációs partnere [103]. Ismert, hogy a HER2 emeli a dimerizációs partnereinek a foszforilációs és aktivációs szintjét. Az EGFR család tagjait, kivéve a HER2-öt, számos ligand képes aktiválni. Az ismert 11 ligandot, a receptorok iránti specifitásuk és affinitásuk alapján, 3 csoportba sorolják [104]. Az első csoportba azokat a ligandokat sorolják, amelyek kizárólag az EGFR-hez kötődnek, ide tartozik az EGF, AR, EPG és TNF α . Második csoportba tartozik az epiregulin, a HB-EGF és a betacellulin, amelyek az EGFR mellett a HER4-hez is kötődnek. A harmadik csoportba a NRG-ok tartoznak, melyek a HER3 és a HER4 természetes ligandjai [105].

Az EGFR receptorok az AXL receptorhoz hasonló jeltovábbítási útvonalakat aktiválnak. Mind a négy EGFR, a dimerizációt követően a Grb2 és a Shc adaptor fehérjéken keresztül aktiválják a MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT és a PLC γ útvonalakat. Jelenleg számos EGFR-t és HER2-t célzó gyógyszer alkalmaznak sikerrel első vonal beli terápiaként: például az EGFR gátló Erbitux monoklonális antitestet [106], Gefitinib és Erlotinib [107] tirozin kináz gátló szereket, a HER2-t gátló Trastuzumab monoklonális antitestet és a Lapatinib tirozin kináz gátlót amelyik EGFR/HER2 kettős gátlóként közismert. Ezek az

inhibitorok hatékony kezelési módot jelentek számos daganatféleség esetében, de az elsődleges és a szerzett rezisztencia kialakulásának a problémája még mindig megoldásra vár.

Az AXL tirozin kináz receptor expresszióját és aktivációját, már számos gyógyszerrezisztens daganatos sejtvonalban megfigyelték. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy AXL tirozin kináz receptornak fontos szerepe lehet a kemoterápia-rezisztencia kialakulásában. Nemrég kimutatták, hogy az Erlotinibbel kezelt EGFR mutáns tüdő sejtvonalakban és xenograftokban az AXL aktivációja fontos szerepet játszik az Erlotinibbel szembeni rezisztencia kialakításában. Ezekben a sejtekben az AXL gátlása helyreállította a daganatos sejtek Erlotinib iránti érzékenységét [108]. Ezen kívül, számos tanulmány mutatott ki magas AXL expressziót Lapatinib rezisztens HER2 pozitív emlőtumoros sejtvonalakban, Erlotinib rezisztens fej-nyaki daganatos sejtvonalakban, Imatinib (BCR/ABL gátló) rezisztens gasztrointestinális sztróma tumorokban, Nilotinib (Abl, PDGFR gátló) rezisztens krónikus leukémia sejtekben, BMS-754087 rezisztens rhabdomyosarcoma sejtekben, és és Ciszplatin rezisztens petefészek és nyelőcső adenokarcinomákban [109-117].

2.4.8. AXL gátló vegyületek

Számos olyan stratégia létezik, ami által a receptor tirozin kinázok aktivitását gátolhatjuk. Gyógyszerfejlesztési szempontból a két legígéretesebb a receptor extracelluláris doménjéhez kötődő monoklonális antitestek és a kináz domén ATP kötő zsebébe illeszkedő kismolekulájú gátlószer használata. A monoklonális antitestek megakadályozzák a ligand kötődését a receptorhoz, így gátolva a receptor dimerizációját és autofoszforylációját. A kismolekulájú kinázgátlók pedig az ATP-vel versenyeznek az ATP kötő zsebért. Ez utóbbi jelenleg a legintenzívebben tanulmányozott stratégia.

Jelenleg kevés olyan monoklonális és poliklonális antitest ismert, amely az AXL tirozin kináz receptort célozza [98]. A legismertebb monoklonális antitest az YW327.6S2, amely a többi monoklonális antitesthez hasonlóan a receptor extracelluláris részéhez kötődik,

gátolja a Gas6 kötődését, aminek következtében az AXL aktivációja elmarad. Preklinikai vizsgálatok igazolják, hogy tüdő xenograftos modellekben növeli az Erlotinib és Carboplatin/Paclitaxel hatását [118].

Habár a mai napig nem létezik kifejezetten AXL gátló gyógyszer, az eddig engedélyezett, illetve fejlesztés alatt álló, más célpontok ellen tervezett kis molekulájú tirozin kináz inhibitorok közül sok gátolja az AXL kinázt is.

Az Amuvatinib (MP-470, Supergen) volt az első olyan tirozin kináz inhibitor, amelyről bebizonyosodott, hogy az AXL receptor tirozin kinázt is gátolja [112]. Habár eredetileg c-Kit gátlónak tervezték, szelektíven gátolja a c-Met, c-Ret, PDGFR- β kinázokat is. Prostatadaganatokban az Erlotinibbel együtt alkalmazva elősegíti a HER1, HER2 és HER3 gátlását [119].

A Foretinib (GSK1363089, GlaxoSmithKline) eredetileg c-Met, c-Kit, FLT3, Tie2 és VEGFR2 inhibitoroként vált közismerté, de nemrég kiderült, hogy az AXL-t is gátolja [120, 121]. A c-Met amplifikációval és EGFR overexpresszióval rendelkező tüdődaganatokban a Foretinib növelte az Erlotinib hatását [122]. Hasonlóképp, Lapatinib rezisztens emlődaganat sejteket a Foretinib -az AXL gátlása révén- újra Lapatinib érzékennyé tette [120].

A Bosutinib (SKI606, PF-5208763, Pfizer) eredetileg Src/Abl kináz inhibitornak lett kifejlesztve, de mikromólaris koncentrációban AXL-t is gátolja [123]. Később kiderült, hogy ez a vegyület sokkal hatásosabban gátolja a BCR-ABL receptort, mint az Imatinib [124]. Jelenleg fázis II-es klinikai vizsgálatokban szerepel emlődaganatos betegeken és fázis III-ban Ph+ CML-es betegeken [125].

A BMS-777607 (Bristol-Myers Squibb), c-Met inhibitor, amely sokkal szelektívebben gátolja AXL-t mint a c-Met kinázt [126]. Ez a vegyület hatékonynak bizonyult humán gyomor karcinoma xenograftokban, továbbá klinikai fázis I-ben és II-ben előrehaladott stádiumú gyomor-nyelőcső daganatokban is vizsgálták.

Kifejezetten AXL gátlásra tervezett molekulák közül az R428-at (Rigel) és az MPCD84111-et érdemes megemlíteni. Az R428 multikináz inhibitor, de mintegy 15-ször alacsonyabb koncentrációban gátolja az AXL receptor tirozin kinázt, mint a többi célpontját

[97]. Preklinikai vizsgálatokban elősegíti a ciszplatin hatását és csökkenti az emlődaganatos sejtek metasztatizálását.

Az MPCD84111-et hatóanyagot AXL tirozin kináz gátlónak tervezték a Vichem Chemie Kutató dolgozói és a Max Planck Intézet által a WO2011045084 kód alatt van szabadalmaztatva. A Szokol et al. 2014 publikációjában leírt 10-es vegyület is hasonló szerkezettel és hatásspektrummal rendelkezik, mint az MPCD84111-es AXL inhibitor [127].

3. Célkitűzések

Habár számos irodalmi adat igazolja az AXL tirozin kináz szerepét a daganatos sejtek migrációjában és a gyógyszer-rezisztencia kialakításában, ez idáig az AXL pontos szerepe ezekben a folyamatokban nyitott kérdés maradt. Doktori munkám első részében az AXL receptor tirozin kinázt célzó kinázgátlóknak tripla negatív emlődaganat sejtvonalak migrációjára gyakorolt hatásával foglalkoztam.

Elsődleges céлом az volt, hogy megvizsgáljam a már publikált BMS777607, SKI606 és a Max Planck Intézet által szabadalmaztatott MPCD84111 AXL receptor tirozin kináz gátlók migráció gátló hatékonyságát tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakban.

Kísérleteim során a következő kérdésekre szerettem volna választ kapni:

- 1) Befolyásolja-e AXL receptor tirozin kináz expressziója és foszforilációja a tripla negatív emlődaganatok migrációját, és ha igen, mily módon.
- 2) Van-e különbség az AXL receptor tirozin kináz gátló hatóanyagok migráció gátló képességében és hatásmechanizmusában

Munkám második részében különböző eredetű, az AXL tirozin kinázt fokozottan expresszáló daganatos sejtvonalakban tanulmányoztam az AXL gátlás ellen kialakuló rezisztenciát, különös tekintettel más tirozin kináz receptorok aktivációjára.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestem a választ:

- 3) Milyen hatással van az AXL tirozin kináz gátlása a többi receptor tirozin kináz aktivációjára és foszforilációjuk mintázatára?
- 4) Milyen kombinációs kezelésekkel előzhető meg az AXL gátlókkal szembeni kompenzációs mechanizmusok kialakulása?

4. Anyag és módszer

4.1. Sejtvonalak

Kísérleteink során a Max Plank információs adatbázisa alapján különböző eredetű AXL overexpresszióval rendelkező tumoros sejtvonalat használtunk. Ebből hat tripla negatív emlődaganat (MDA-MB-231, MDA-MB-231-D3H2LN, Hs578T, BT549, MDA-MB-436, MDA-MB-468), négy sejtvonal glioma (A172, U373, SF126, U118), négy tüdő (H1975, H1299, H292, A549), három hasnyálmirigy (AsPC-1, BxPC-3, Capan-2), két petefészek (OVCAR8, SCOV3), egy méhnyakrák (C4-I) és egy fibroblaszt (NIH/3T3) eredetű volt. Az MDA-MB-231-es sejtvonalat Stefano Iacobelli (Department of Oncology and Experimental Medicine, University Foundation 'G. D'Annunzio', Chieti-Pescara, Chieti, Olaszország), a Hs578T sejtvonalat pedig az U3 Pharma (Martinsried, Németország) bocsátotta a rendelkezésünkre. A többi sejtvonal az ATCC sejtbankból származott. Az MDA-MB-231, MDA-MB-231-D3H2LN, Capan-2, A549, AsPC-1, A172, U373, SF126 és U118 sejtvonalakat DMEM médiumban (GIBCO, Invitrogen, Bleiswijk, Hollandia), míg a Hs578T, H1975, H1299, H292, OVCAR8, BxPC-3, BT549, MDA-MB436, MDA-MB468 sejtvonalat RPMI 1640 médiumban (GIBCO, Invitrogen, Bleiswijk, Hollandia) tenyésztettük. A SCOV3 sejtvonalat 10%-os FBS tartalmú McCoy's 5A médiumban növesztettük. A DMEM médium 1% Na-piruvátot (GE Healthcare, Bécs, Ausztria), 1% (v/v) penicillin-streptomycin antibiotikumot (GE Healthcare, Bécs, Ausztria) és 10% (v/v) FCS-t, (GIBCO, Invitrogen, Bleiswijk, Hollandia) tartalmazott. Az RPMI 1640 médium 1% (v/v) glutamint, 1% (v/v) penicillin- streptomycin antibiotikumot (GE Healthcare, Bécs, Ausztria) és 10% (v/v) FCS-t (GIBCO, Invitrogen, Bleiswijk, Hollandia) tartalmazott. A sejteket 37°C-on, 5%-os CO₂-termosztátban tartottuk.

4.2. Tirozin kináz inhibitorok és monoklonális antitestek

A Lapatinib, az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorokat a Vichem Chemie Kutató Kft. (Budapest, Magyarország) szintetizálta, míg a BMS777607 és az R428 inhibitorokat az LDC Discovery GmbH-től (Dortmund, Németország) kaptuk. Az inhibitorokat DMSO-ban oldottuk 10 mM koncentrációban és szobahőmérsékleten tároltuk. A Herceptin és Erbitux monoklonális antitesteket a martinsriedi Max-Planck Gyógyszertárból vásároltuk.

4.3. Ligandok és Batimastat

A rekombináns humán NRG1-et (#396-HB-050) és Batimastat-ot (BB94, #2961) az R&D Systems GmbH-től (Németország) vásároltuk.

4.4. RNS interferencia, géncsendesítés

Az 50-70% konfluenciájú sejteket 40 nM-os végkoncentrációban kezeltük Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, Darmstadt, Németország) transzfekciós reagens és OptiMEM (GIBCO, Invitrogen, Bleiswijk, Hollandia) médiumban oldott kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal. A kísérlet során különböző gén specifikus siRNS-t (ref. kódok: Ambion siRNA AXL 1845, p130Cas 18372, 18373; Lyn 8356, 277; Met 8701; HER2 540; HER3 4780 és Dharmacon EGFR J-003114-13) használtunk. Kontrollként a sejteket negatív siRNS-sel kezeltük (Ambion kontroll siRNS # 1), amelyik semmilyen ismert mRNS szekvenciával nem mutat homológiát. 24 óra elteltével médiumot cseréltünk, majd újabb 24 órás inkubációt követően a sejteket lizáltuk vagy további kísérletekhez passzáltuk.

4.5. A sejtproliferáció vizsgálata (CellTiterGlo assay)

A sejteket 96 lyukú tenyésztő lemezekre (Perkin Elmer) raktuk ki, wellenként 1000 sejtet 50 µl-be. 24 óra inkubálás után a kívánt koncentrációjú kináz inhibitorokkal kezeltünk, majd 72 óráig inkubáltunk 37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében. A három napos inkubáció leteltével a sejtek életképességét 'CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay' kit (Promega, Mannheim, Németország) segítségével határoztuk meg, a gyártó leírásának megfelelően. A lumineszcenciát Microplate Luminometer LB96V készülék (Berthold Technologies) segítségével detektáltuk.

4.6. SDS-PAGE és Western blot

A sejteket 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇·10 H₂O, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF és 10 mg/ml aprotinint tartalmazó lizis pufferben lizáltuk. Ezt követően a lizátumok fehérje tartalmát BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL USA) segítségével határoztuk meg. Az egyenlő fehérje tartalmú mintákhoz Laemli mintapuffert (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerin, 50 mM DTT, 0,01% (w/v) brómofenolkék) adtunk majd 5 percig forralva denaturáltuk őket.

Az SDS-PAGE-t 12% akrilamid koncentrációjú gélen végeztük mólsúly standard jelenlétében (low range, Biorad). A fehérjéket a gélről nitrocellulóz membránra (Whatmann, Maidstone, Egyesült Királyság) blottoltuk, 150 V konstans feszültségen, 3 órán keresztül, félszáraz blottolási körülmények között.

A membrán nem specifikus kötőhelyeinek blokkolására 10% (v/v) NET zselatint tartalmazó blokkoló puffert használtunk 1 órán át. A membránokat az elsődleges antitesttel 1:2000 hígításban, NET zselatint tartalmazó pufferben inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A p-Lyn (Y507) # 2731, p-Src (Y416) #2101, p-Pyk (Y580) #3291, p FAK (Y576/577) # 3281, p130Cas (Y410) #4011, p-HER3 (Y1289) #4791, p-HER2 (Y1248) #2247, EGFR #2232 és p-AKT (S473) #9271 antitesteket a Cell Signalling Technologies-tól, a HER2 #06-562 és a

HER3 #05-390 antitesteket a Millipore-tól, az anti-Met-et #sc-161 a Santa Cruz Biotechnology-tól míg az anti-tubulin ellenanyagot #T1926 a Sigma- Aldrich-tól rendeltük. A foszforilált tirozinok detektálásához a Max Planck Intézetben szintetizált antitesteket használtunk. Az inkubációt követően a membránokat 10 % (v/v) NET zselatint tartalmazó pufferrel mostuk 20 percenként 5 körben, majd az elsődleges antitestnek megfelelően szobahőmérsékleten HRP-kötött kecske anti-nyúl (Bio-Rad, München, Németország) és kecske anti-egér (Sigma, München, Németország) másodlagos antitesttel inkubáltuk 1 órán keresztül. Újabb 5x20 perc NET-es mosást követően az immunreakciók eredményét ECL Advanced Western Blotting Detection kit (Perkin Elmer Rodgau, Németország) segítségével detektáltuk. Az előhívás Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Ismaning, Németország) filmmel történt. A Western blototos sávok sűrűségét ImageJ 1.47 szoftverrel mértük meg.

4.7. Humán foszfo- RTK array, humán RTK chip

A humán foszfo-RTK array-t (R&D Systems GmbH, Németország, #ARY001) a gyártó protokollja alapján használtuk. A kezelt sejteket 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF és 10 mg/ml aprotinint tartalmazó lizis pufferrel lizáltuk. A membránokat 500 µg fehérjét tartalmazó mintával 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A membránokat ECL Advanced Western Blotting Detection kit (Perkin Elmer Rodgau, Németország) segítségével detektáltuk. Az előhívás Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Ismaning, Németország) filmmel történt.

4.8. Immunoprecipitáció

Az antitesteket A-sepharose gyöngyökkel (GE Healthcare, Németország, #17-5280-04) és lizis pufferrel inkubáltuk 40 µl végtérfogatban 1 órán keresztül, majd a Western blottnál használt lizis pufferrel háromszor megmostuk. Az így előkészített gyöngyöket a

vizsgálendő fehérje mintákkal inkubáltuk 4°C-on 16 órán keresztül. Az inkubáció után a mintákat lizis pufferrel háromszor megmostuk, majd a lecentrifugált pallethez Laemmli puffert adtunk és 10 percig főztük. Az immunoprecipitált proteineket SDS-PAGE és Western blot után anti-foszfo tirozin antitesttel (4G10, Max Planck Intézet, Martinsried, Németország) jelöltük és ECL Advanced Western Blotting Detection kit (Perkin Elmer Rodgau, Németország) segítségével detektáltuk. Az immunoprecipitációs kísérletekhez használt HER3 (#05-390) és HER2 (#06-562) antitesteket a Millipore-tól rendeltük.

4.9. 3D szferoid kultúra

A 96 lyukú szövettenyésztő lemezt 80 µl 3 mg/ml koncentrációjú Matrigellel (BD Bioscience, USA, #354234) vontuk be, majd egy éjszakán át, 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően lyukanként 7000 sejtet tartalmazó 120 µl médiumot pipettáztunk a már szilárd Matrigel-re, majd a megfelelő koncentrációjú inhibitorral kezeltünk. A sejteket 72 óráig inkubáltuk azért, hogy szferoidokba csoportosuljanak.

4.10. Sejtmigrációs vizsgálat

A sejtmigráció méréséhez a Boyden kamra assay-t használtuk. A sejteket kirakás előtt 0.1% (v/v) FCS-t tartalmazó médiumban felfuszpendáltuk, majd a 8 µM pórus nagyságú Boyden kamra (BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Németország) felső osztatába 50.000 ezer sejtet tettünk ki. A kamra alsó osztatába kemoattraktánsként 1%-os (v/v) FCS-t tartalmazó médiumot helyeztünk. Az AXL inhibitorok vizsgálata esetén a kamra felső és alsó osztatába is pipettáztunk a kívánt koncentrációjú inhibitorokból. A sejteket 3.5 órán keresztül inkubáltuk, majd a membránon keresztül migrált sejteket 0.05%-os (v/v) Crystal violet/ 20%-os (v/v) metanollal (Sigma, Steinheim, Németország) fixáltuk és festettük. 20 perces inkubációt követően a megfestett sejteket desztillált vízzel megmostuk, majd a felső kamrát egy gyapot tamponnal kitisztítottuk. A membránon keresztül migrált sejtekről kamránként legalább 5 véletlenszerű helyen fényképet készítettünk Axiovert 300

Mikroszkoppal (Zeiss, Jena, Németország). Az így készült fényképek alapján a MetaMorph szoftverrel kvantifikáltuk (6.2r4 verzió, Molecular Devices) a membránon átmigrált sejteket.

4.11. Kvantitatív PCR

A kvantitatív PCR kísérlethez az MDA-MB-231 sejteket 10 μ M BMS777607 vegyülettel vagy DMSO-val (hordozó) kezeltük. Az RNS izolálása (RNeasy Mini Kit-50; QIAshredder, QIAGEN) és a specifikus egy szálú cDNS (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Fisher Scientific) szintézise a gyártó ajánlásai alapján történt. A cDNS szintéziséhez 1 μ g teljes RNS-t és 200 ng radom hexamer primert használtunk. A NCBI adatai alapján 17 különböző humán NRG1 izoformát vizsgáltunk: #1 NM_001159995.1; #2 NM_001159996.1; #3 NM_001159999.1; #4 NM_001160001.1; #5 NM_001160002.1; #6 NM_001160004.1; #7 NM_001160005.1; #8 NM_001160007.1; #9 NM_001160008.1; #10 NM_004495.3; #11 NM_013956.3; #12 NM_013957.3; #13 NM_013958.3; #14 NM_013959.3; #15 NM_013960.3; #16 NM_013962.2; #17 NM_013964. A HER3 (Gén ID: 2065) esetében 2 különböző izoformát teszteltünk: #1 NM_001982.3 és #2 NM_001005915. A reverz traszkriptázt 1 a 60-hoz arányban kevertük 0,5 μ M gén specifikus primerrel és Fast SYBR® Green Master Mix-el (Applied Biosystems). A PCR-t a gyártó ajánlásai alapján StepOnePlus készüléken (Applied Biosystems) futattuk.

4.12. AXL ELISA

Az AXL ELISA mintát a következőképpen készítettük: lyukanként 75.000 sejtet raktunk ki egy 6 lyukú plate-re, 24 órás inkubáció után szérumentesre cseréltük a médiumot és újabb 24 óráig éhezettük. Ezt követően 1 óráig kezeltünk az inhibitor koncentráció sorokkal, majd 30 percig 250 ng/ml Gas6-al (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Németország) stimuláltuk. Az inkubációs idő leteltével a sejteket jégen, 400 μ l lízis pufferrel (50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% (v/v) Glicerol, 1% (v/v) Triton X-100,

100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇·10 H₂O, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF és 10 mg/ml aprotinin) lizáltuk. A hasonló fehérje mennyiségű mintákat a detektálandó fehérjével bevont 96 lyukú Nunc MicroWell™ plate-re (Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Németország) pipettáztunk. A mintákat másnap eltávolítottuk a lyukakból és a lyukak felszínét mosó oldattal (PBS és 0,05% (v/v) Tween20) ötször átmostuk.

A foszforilált tirozinok detektálásához a Max Planck Intézetben készített biotinilált antitestet (4G10) 10% (v/v) FCS tartalmú mosó oldatban oldottuk, majd wellenként 100 µl-t vittünk fel belőle. 2 órás inkubációt követően a fent említett módon mostuk a plateket. Ezt követően 1 órás inkubáció következett a másodlagos anti-foszfo-tirozin egér antitesttel szobahőmérsékleten. Egy újbb mosási lépés után a floreszcens jel kialakításához az alkaline foszfatáz AttoPhos Substrate Set-et (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) használtuk. Másfél óra inkubáció után a detektálás TECAN Ultra Evolution plate reader-el (430 nm excitáció, 560 nm emisszió) történt.

4.13. NRG1 ELISA

Az ELISA lemezek felszínét 0,05% (v/v) Tween20 és 10% (v/v) FCS tartalmú PBS oldatban 1:180 arányban kihígított biotinilált anti-humán NRG1 β1/HRG1 β1 antitesttel vontuk be (24 óra, 4°C). Mosó pufferrel (lásd 5.15) 5x mostuk a lemezeket, majd 1:4000 hígítású biotin Alkaline Foszfatazzal Konjugált Streptavidin SA110 (Millipore USA) oldattal inkubáltuk őket egy órán keresztül. Újabb mosási lépések után 90 percig inkubáltunk az Alkaline Foszfataz AttoPhos Substrate Set (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) detektáló folyadékkal. Végül a floreszcens szignált 560 nm hullámhosszon detektáltuk a TECAN Ultra Evolution plate reader-el (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Németország).

4.14. AKT foszfo-S473 ELISA

Az ELISA lemezek felszínét 1:180 hígítású biotinilált Pan foszfo-AKT (S473) specifikus ellenanyaggal vontuk be. 24 óra inkubálás után a plate-eket a fentiekben ismertetett módon ötször mostuk, majd felpipettáztuk az egyenlő fehérje tartalmú mintákat. Az inkubálás 24 órán keresztül, 4°C fokon történt. Mosásokat követően a platet 1:4000 hígítású biotin Alkaline Foszfátazzal Konjugált Streptavidin SA110 oldattal inkubáltuk 1 órán keresztül. A mosások után Alkaline Foszfátáz AttoPhos Substrate Set (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) detektáló oldattal szobahőmérsékleten 90 perc rázatás után történt a floreszcens jel detektálása. A detektálás 560 nm hullámhosszon történt TECAN Ultra Evolution plate reader-el (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Németország).

4.15. Az adatok kiértékelése és statisztikai analízis

Minden kísérletet legalább háromszor ismételtünk meg. Az IC₅₀ értékeket a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyított százalékos értékben adtuk meg és XLfit 5.1.0 szoftverrel (IDBS, Surrey, UK) ábráztuk. A statisztikai összehasonlításokat Kruskal-Wallis, Mann-Whitney és Dunnett`s Multiple Comparison Teszttel végeztük. Szignifikánsnak akkor tekintettük a különbséget a Dunnett`s Multiple Comparison Teszt esetében, ha a $p < 0,0001$, míg a Kruskal-Wallis és a Mann-Whitney tesztek esetében, ha a $* = p < 0,05$, $** = p < 0,01$ és $*** = p < 0,001$.

5. Eredmények

5.1. Az AXL receptor tirozin kináz inhibitorok hatása a tripla negatív emlődaganat sejtvonalak migrációjára

5.1.1. Az AXL receptor tirozin kináz gátlása függ a sejtípustól és a tirozin kináz inhibitortól

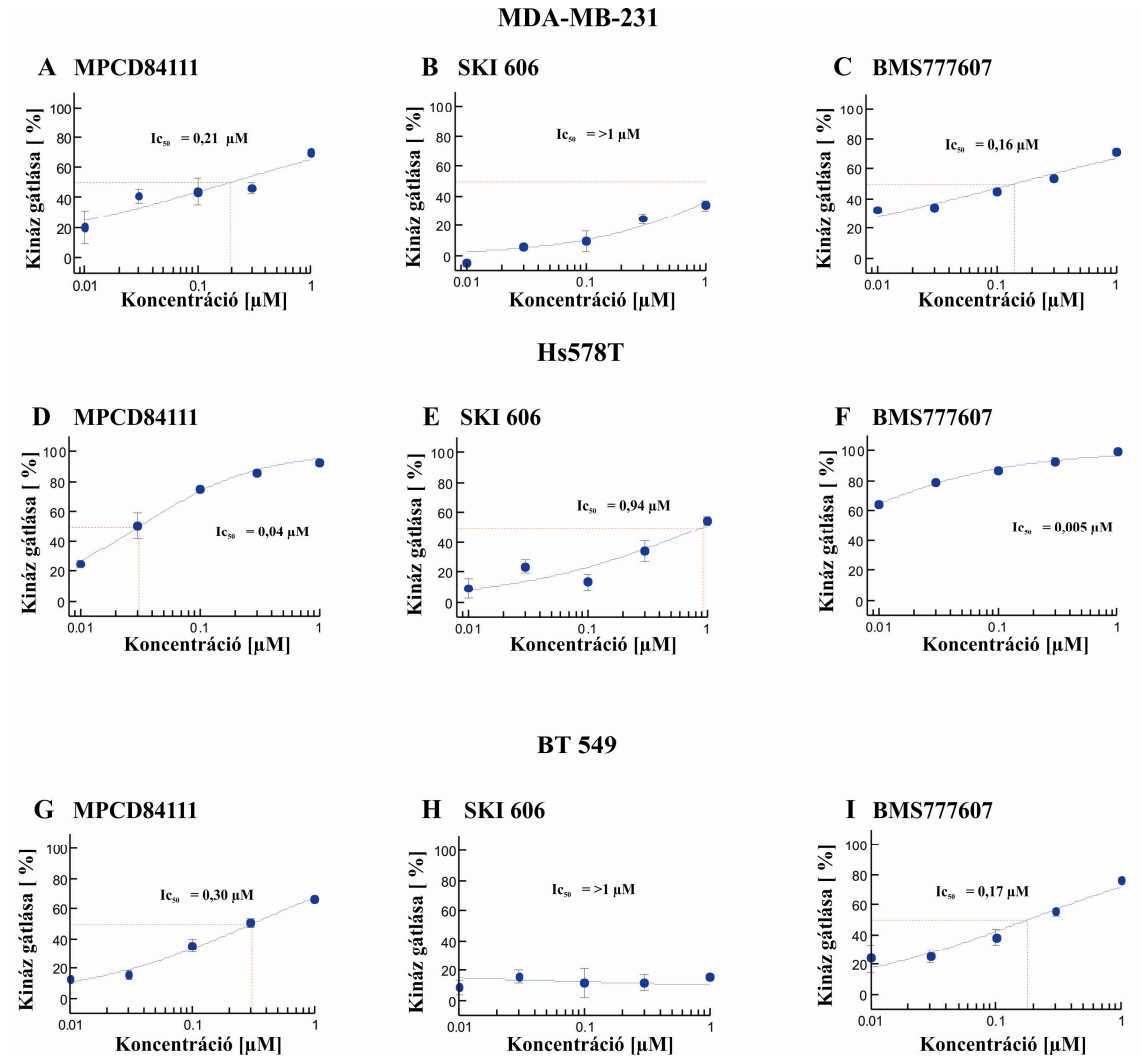
Korábbi tanulmányok már bebizonyították, hogy az AXL receptor tirozin kináznak központi szerepe van a tripla negatív daganat sejtvonalak migrációjában [98, 123]. Mivel a tripla negatív daganatok nehezen gyógyíthatók szerettük volna megvizsgálni, hogy az AXL receptor kináz gátlása milyen hatással van a tripla negatív emlődagnatos sejtvonalak migrációjára. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a BMS777607, az SKI606 és az MPCD84111 kináz inhibitorok hatását a AXL foszforilációjára, a kísérleteinkhez három olyan tripla negatív sejtvonalat (MDA-MB-231, Hs578T és BT549) választottuk ki, amelyekre jellemző az AXL fehérje overexpressziója [123].

A sejteket különböző koncentrációkban kezeltük az inhibitorokkal 1 órán keresztül, majd 30 percig stimuláltunk Gas6-al. Az AXL kináz foszforiláltságát ELISA-val határoztuk meg. Érdekes módon a három AXL tirozin kináz gátló sejtvonalként különböző IC_{50} értékeket mutatott.

Az MPCD84111 AXL kináz foszforiláció gátló IC_{50} értéke az MDA-MB-231-es sejtekben 0,21 μ M, Hs578T sejtekben 0,04 μ M és BT549 sejtekben 0,307 μ M volt (4 A, D, G ábra).

A három AXL tirozin kináz gátló közül az SKI606 inhibitor gátolta a legkevésbé az AXL foszforilációját. Az MDA-MB-231 és a BT549 sejtekben az SKI606 AXL foszforiláció gátló IC_{50} értéke nagyobb volt, mint 1 μ M, míg a Hs578T sejtekben az IC_{50} értéke 0,94 μ M volt (4 B, E, H ábra). A BMS777607 inhibitor AXL foszforiláció gátló IC_{50} értéke az MDA-MB-231 sejtvonalonban 0,16 μ M, Hs578T sejtekben 0,005 μ M és a BT549 sejtekben 0,178 μ M volt (4 C, F, I ábra). Mind a három sejtvonalonban az AXL tirozin kináz

foszforilációját lehatékonyabban a BMS777607 inhibitor gátolta, míg az AXL foszforiláció gátlására legérzékenyebben a Hs578T sejtvonalt reagált

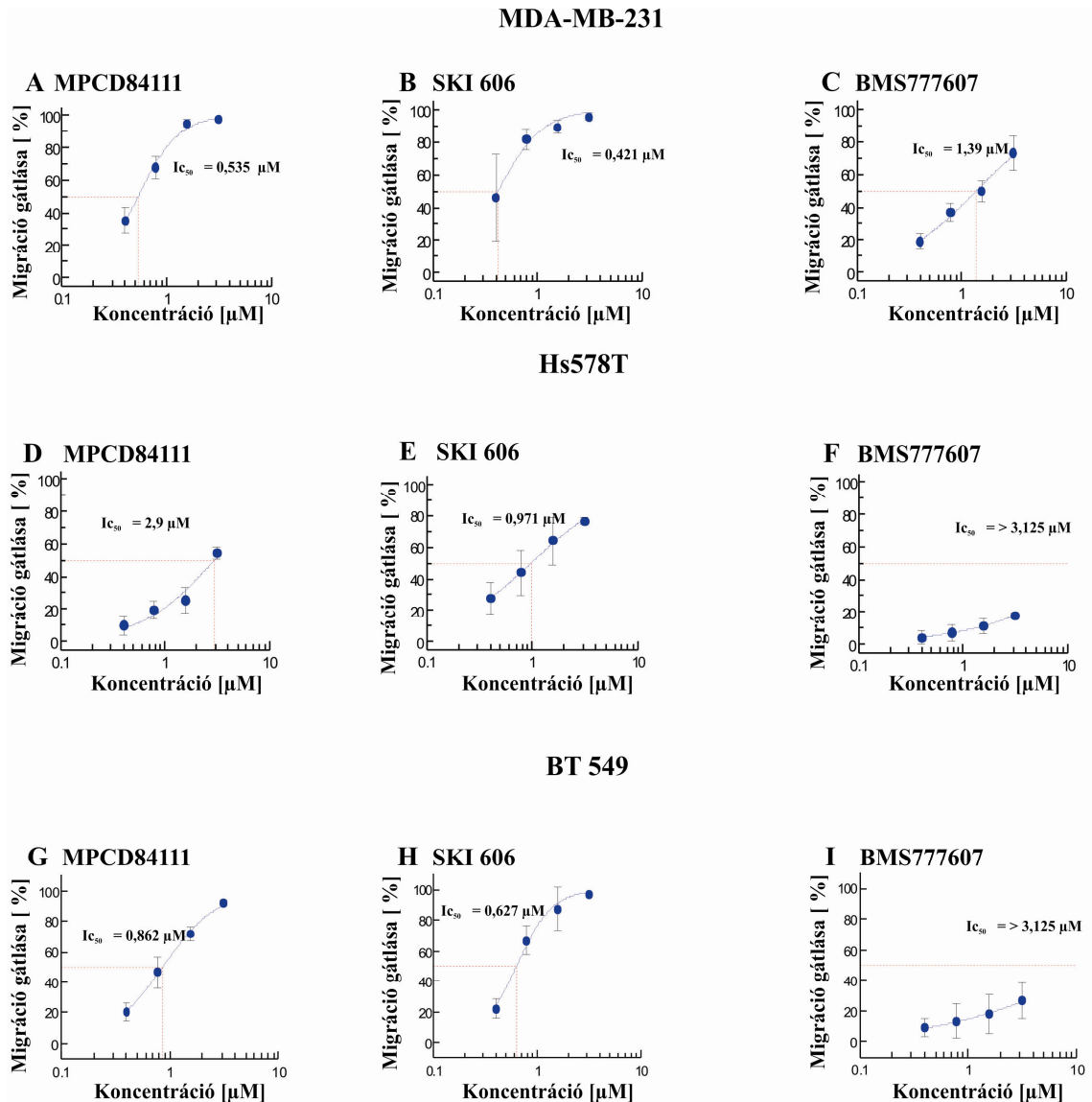


4. ábra. Az AXL receptor tirozin kináz foszforilációjának a gátlása tripla negatív emlődaganat sejtvonalakban

Tirozin kináz inhibitorokkal kezelt MDA-MB-231 (felső), Hs578T (középső) és BT549 (alsó) sejteket 1 órás inkubációt követően 250 ng/ml Gas6-al stimuláltunk 30 percig. Az AXL receptor tirozin kináz foszforilációját ELISA-val mértük meg. A görbék illesztése és az IC_{50} értékek meghatározása XLFit 5.1.0 szoftver felhasználásával történt.

5.1.2. A tirozin kináz inhibitorok migráció és életképesség gátló hatékonysága sejttípusonként változik

A tirozin kináz gátlók sejtmigráció gátló IC_{50} értékeit Boyden kamrás assay-vel határoztuk meg. Az MPCD84111 tirozin gátló az MDA-MB-231 sejtekben $0,535 \mu\text{M}$, a Hs578T sejtekben $2,9 \mu\text{M}$ és a BT549 sejtekben $0,862 \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel gátolta a sejtmigrációt (5 A, D, G ábra). Az SKI606 sejtmigráció gátló IC_{50} értékei az MDA-MB-231-es sejtekben $0,421 \mu\text{M}$, a Hs578T sejtekben $0,971 \mu\text{M}$ és a BT549 sejtekben $0,627 \mu\text{M}$ voltak (5 B, E, H ábra). A vizsgált inhibitorok közül a BMS777607 sejtmigráció gátló IC_{50} értékei voltak a legmagasabbak (MDA-MB-231: $0,865 \mu\text{M}$, Hs578T és BT549: $>3,125 \mu\text{M}$).



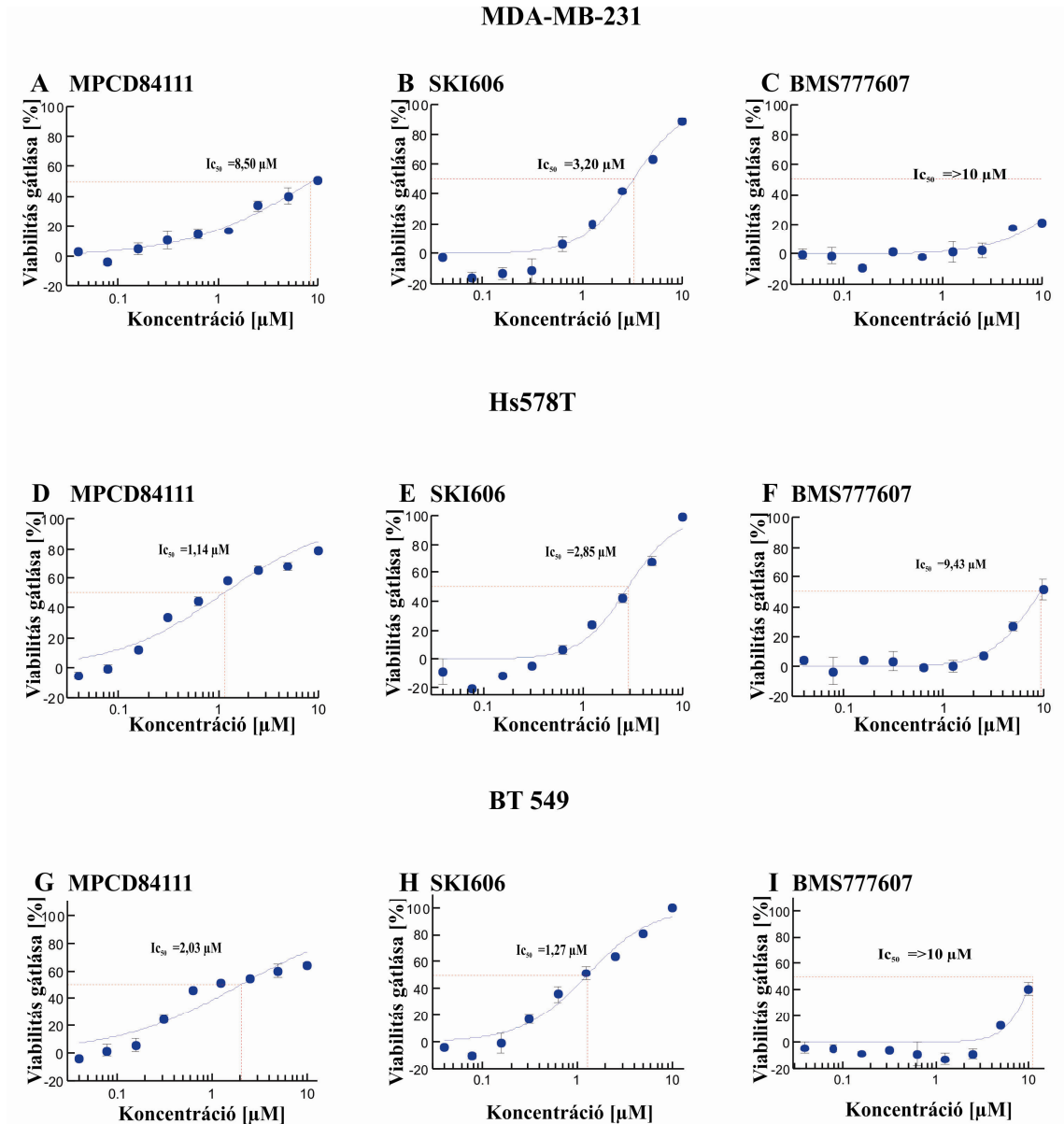
5. ábra. AXL tirozin kináz inhibitorok migráció gátló hatása tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakban

A tirozin kináz inhibitorokkal kezelt MDA-MB-231 (felső) Hs578T (középső) és BT549 (alsó) sejtek migrációját Boyden kamrás assay-vel ellenőriztük. A görbék illesztése és az IC_{50} értékek meghatározása XLFit 5.1.0 szoftver felhasználásával történt.

Hogy megvizsgáljuk az inhibitorok hatását a sejtvonalak életképességére az előző napon kirakott sejteket 10 μM koncentrációtól induló, 10 pontos felező hígítási sor megfelelő

koncentrációival kezeltük, majd további 72 óráig inkubáltuk. Ahogy a 6-os ábra is mutatja, az SKI606 és az MPCD84111 szignifikánsan gátolták a BT549 és a Hs578T sejtvonalak életképességét, ugyanakkor a BMS777607 inhibitor nem okozott szignifikáns eltérést ezeknek a sejtvonalaknak a viabilitásában (6 D, E, F, G, H, I). Az MDA-MB-231-es sejtvonalon mért IC_{50} értékek mindig magasabbak voltak, mint a BT549 vagy a Hs578T sejtvonal IC_{50} értékei (6 A, B, C ábra).

Következtetesképpen elmondhatjuk, hogy a sejtvitalitás gátlás IC_{50} értékei minden esetben, míg a migráció gátlás IC_{50} értékei általában magasabbak voltak, mint az AXL aktivitás gátlásának IC_{50} koncentrációi ugyanazon sejtvonalon és kezelőszer esetében.



6. ábra. Az *AXL* tirozin kináz inhibitorok viabilitás gátló hatása a tripla negatív emlődaganat sejtvonalakban

A tirozin kináz inhibitorokkal kezelt MDA-MB-231 (felső), Hs578T (középső) és BT549 (alsó) sejtek IC_{50} értékeinek a meghatározását 72 órás inkubáció után CellTiter Glo lumineszcens assay-vel vizsgáltuk. A görbék illesztése és az IC_{50} értékek meghatározása XLFit 5.1.0 szoftver felhasználásával történt.

5.1.3. A vizsgált AXL inhibitorok kináz szelektivitás profilja különbözik

Ahhoz, hogy megértsük, hogy az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorok miért gátolják jobban a tripla negatív daganatsejtvonalak migrációját, mint a BMS777607, egy sejtalapú „profiling assay”-vel meghatároztuk az inhibitorok szelektivitás profilját. A sejtalapú „profiling assay”-hez a Hs578T sejtek sejtlizátumát használtuk. Az assay különböző technológiák (SILAC és ITRAQ) felhasználásával meghatározza az inhibitor kötődési affinitását (K_d) a vizsgálandó célmolekulákhoz. Mivel a BMS777607 inhibitor szelektivitás profilját már korábban leírták Schroeder et al. publikációjában [126], ezért csak az SKI606 és az MPCD84111-es inhibitorokat vizsgáltattuk meg a fent említett assay-ben.

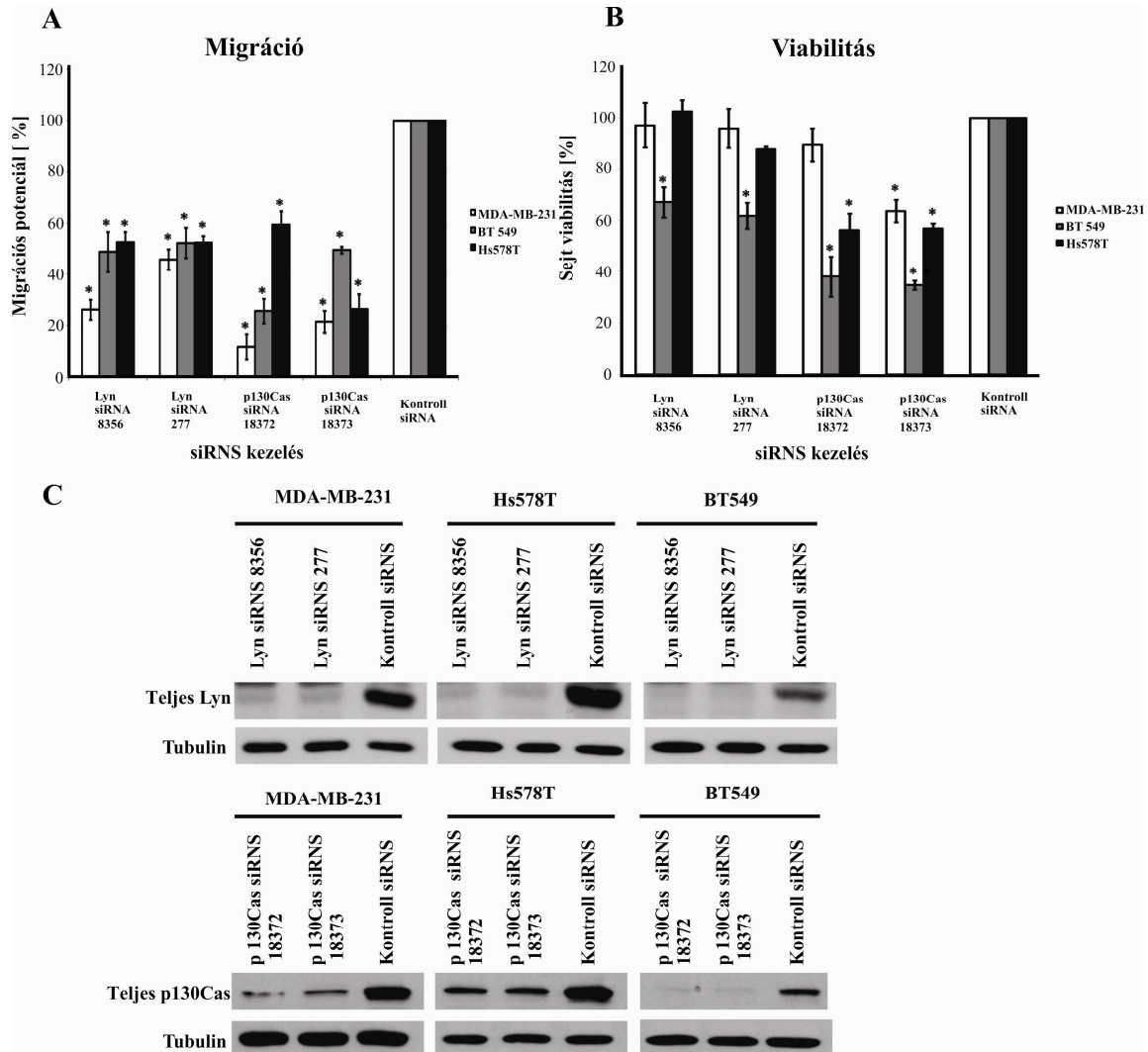
A függelék 1-es táblázatából kitűnik, hogy az SKI606 főképpen a Src család tagjaihoz (Lyn, Src, Fyn és Yes), a MAPK család tagjaihoz, az Ephrinekhez és a PKC család tagjaihoz kötődik. Az MPCD84111 szorosán kötődik az AXL, a Met és az Aurora B kinázhoz, de az SKI606-hoz hasonlóan a Lyn, a Yes és a Src kinázokhoz is nagy az affinitása. Hasonlóan az MPCD84111 inhibitorhoz, a BMS777607 célpontjai közé tartozik a Met és az Aurora B kináz is. Az AXL tirozin kináz receptort mind a három inhibitor célozza.

Ezeknek az eredményeknek a tudatában kiválasztottunk 84 kinázt, hogy azokon pontosabban megmérjük az inhibitorok hatásereőségét. A vizsgálatokat 1 μ M inhibitor koncentráció mellett a Millipore cég végezte radiometria alapú assay-ben. A kapott eredmények jól korreláltak kötődési assay-vel. Az MPCD84111 és az SKI606 inhibitorok hasonló intenzitással gátolták a Src család tagjait és az Abl, a PTK5, az EGFR, az ErbB4, a Lok, a Tie2 kinázokat, míg a BMS777607 és az MPCD84111 a MET család tagjainak (c-Met, Ron) és az Aurora család tagjainak (Aurora A, Aurora B és Aurora C) az aktivitására voltak negatív hatással (Függelék 1. ábra). Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az MPCD84111 és az SKI606 kináz inhibitorok sejtmigráció gátlása elsősorban annak köszönhető, hogy gátolják a Src tirozin kináz család tagjait.

5.1.4. A Lyn és a p130 Cas különböző szerepet játszik a tripla negatív sejtvonalak migrációjában és viabilitásában

Az SKI606 és az MPCD84111 által célzott Src család tagjai közül a Lyn tirozin kináz mind a három tripla negatív sejtvonalban overexpresszált [128]. Ennek az irodalmi adatnak a tudatában választottuk ki a Lyn tirozin kinázt és egy, a sejtmigrációban fontos szerepet játszó állványfehérjét, a p130Cas-t. Az MDA-MB-231, a Hs578T és a BT549 sejtvonalak migrációjában és viabilitásában betöltött szerepük vizsgálatához a kiválasztott fehérjéket siRNS kezeléssel csendesítettük, majd a géncsendesítés eredményességét Western blot analízissel validáltuk (7 C ábra).

A Lyn és a p130Cas fehérjék géncsendesítése után mind a három vizsgált sejtvonal migrációja szignifikánsan lecsökkent (7 A ábra). A Lyn siRNS kezelések nem gátolták, viszont a p130Cas siRNS kezelés szignifikánsan lecsökkentette az MDA-MB-231, a Hs578T és a BT549 sejtvonalak viabilitását (7 B ábra). Az, hogy a Lyn és a p130Cas siRNS kezelések szignifikánsan gátolták a sejtvonalak migrációját, arra enged következtetni, hogy a Lyn és a p130Cas fontos szerepet tölt be ezeknek a sejteknek a migrációjában.

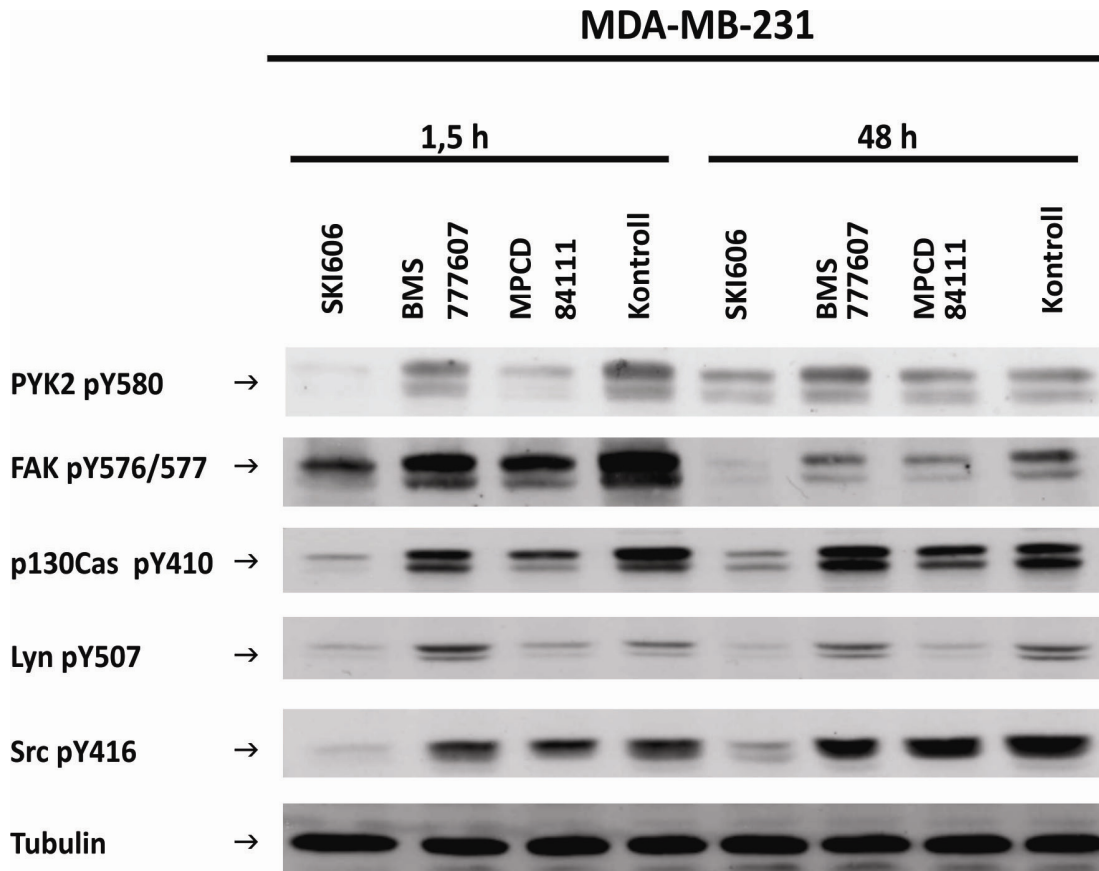


7. ábra. A Lyn és a p130Cas fehérjék szerepe a tripla negatív emlődaganat sejtvonalak migrációjában és életképességében.

A Lyn és a p130Cas siRNS-el kezelt sejtek migrációját Boyden kamrás assay-vel (A), míg viabilitásukat CellTiter Glo lumineszcens assay-vel (B) vizsgáltuk. Az AXL siRNS kezeléseket eredményességét Western blottal ellenőriztük (C) A diagramokon az átlag és szórások fel vannak tüntetve, $*=p<0.0001$, Dunnett-féle Többszörös Összehasonlítás Teszt.

5.1.5. Az MPCD84111 és az SKI606 gátolja a tripla negatív sejt vonalak migrációs jel továbbitási út vonalait

Az előző részben ismertetett eredmények arra utalnak, hogy az MPCD84111 és az SKI606 sejt migráció gátló hatása annak köszönhető, hogy az AXL mellett más migrációs kinázok aktivitását is gátolják. Hogy erről még jobban megbizonyosodjunk, az éheztetett sejteket 1 μ M koncentrációjú SKI606, BMS777607 és MPCD84111 inhibitorokkal kezeltük 1,5 és 48 óráig, majd Western blot tál ellenőriztük a főbb sejt migrációs kinázok és a p130Cas állvány fehérje aktivációs foszforilációs helyeit.

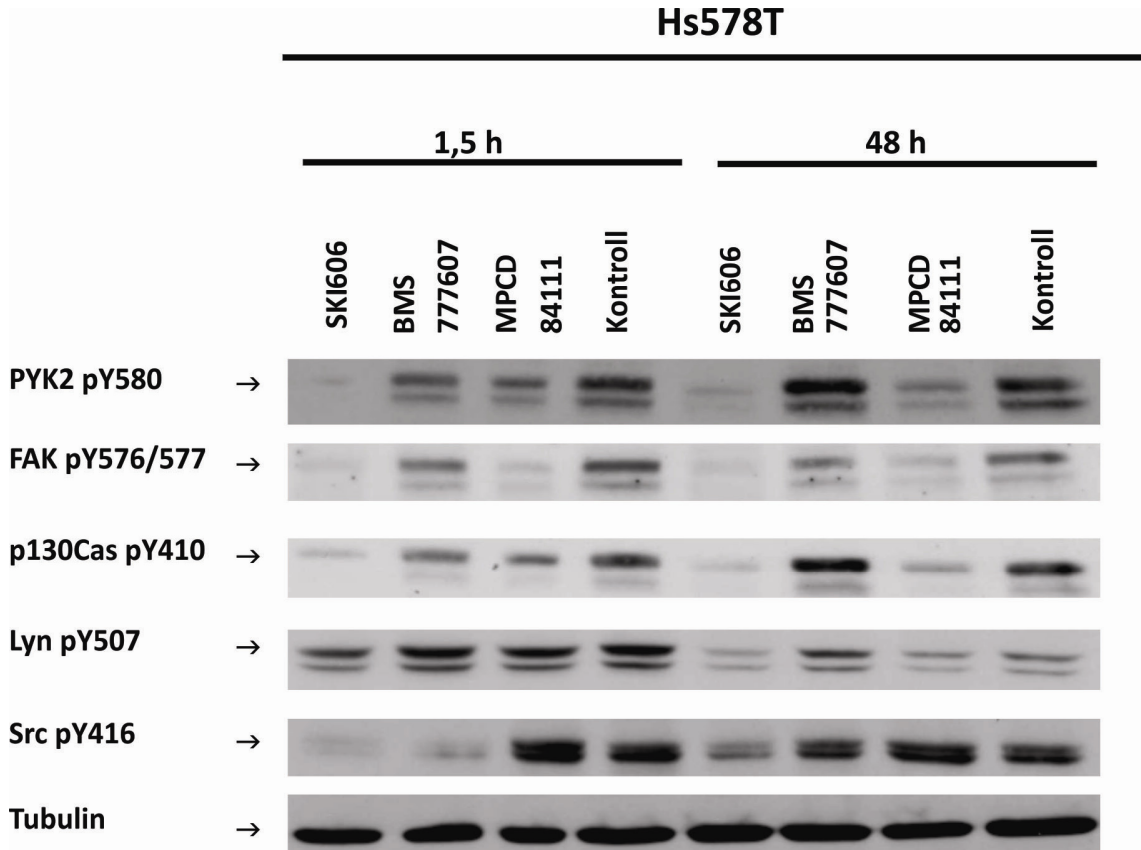


8. ábra. Az AXL tirozin kináz inhibitorok migrációs kinázokra gyakorolt hatása.

Az MDA-MB-231 sejtvonalat 1,5 vagy 48 óráig kezeltük 1 μ M MPCD84111-el, SKI606-al vagy BMS777607-el. A migrációs kinázok (Pyk2, FAK, Lyn, Src) és p130Cas állványfehérje foszforiláltságát Western blottal határoztuk meg

Ahogy a 8-as, 9-es és 10-es ábra is mutatja, az MPCD84111 és az SKI606 hosszútávon gátolta a Lyn, a Pyk2, a FAK és a p130Cas foszforilációját mind a három sejtvonalban. A Hs578T sejtvonalban 1,5 órás SKI606 és MPCD84111 kezelés után a Lyn foszforilációja még nem változott szignifikánsan (10-es ábra). A vártaknak megfelelően az SKI606 gátolta a Src Y416 foszforilációját, de az MPCD84111 inhibitor nem blokkolta ennek a kináznak az aktivitását. A BMS777607-al történt kezelés pedig nem módosította szignifikánsan a vizsgált migrációs kinázok foszforilációját, ez alól kivételt csak a c-Src képezett, amelynek

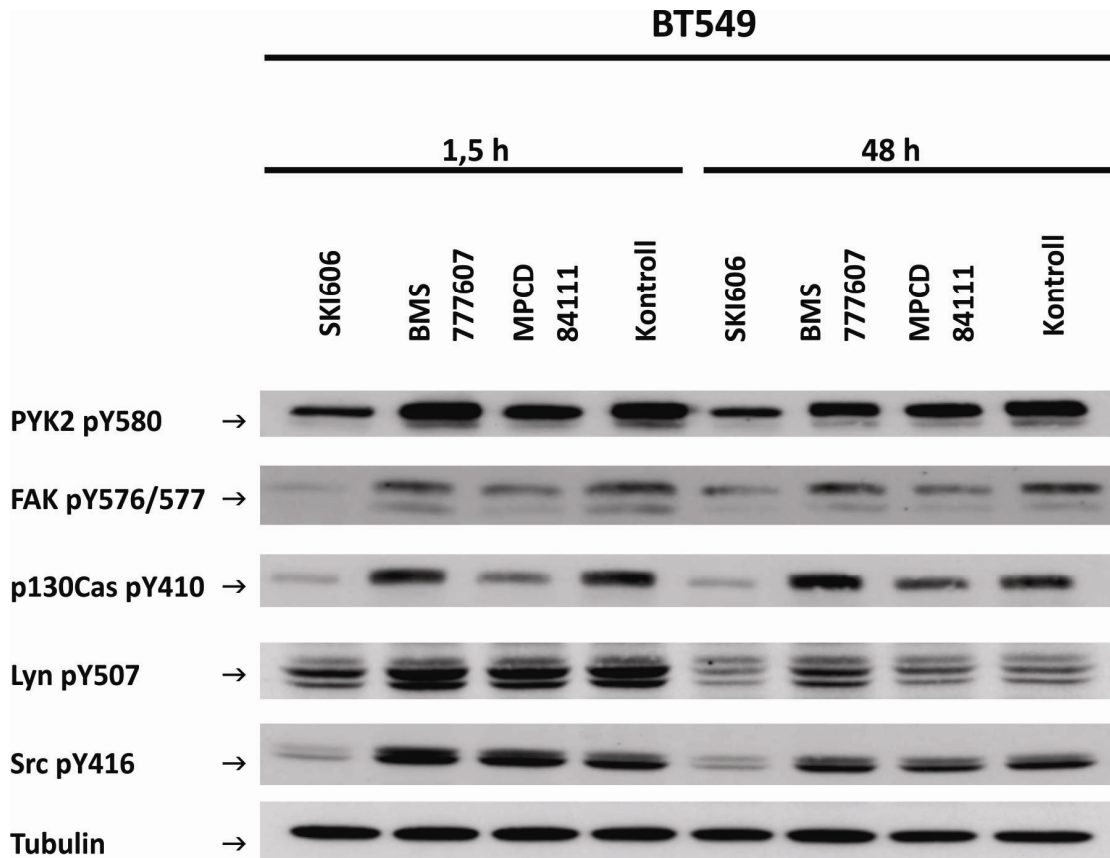
az aktivitása a Hs578T sejtvonalban 1,5 órás kezelés után lecsökkent, viszont 48 óra múlva helyreállt.



9. ábra. Az AXL tirozin kináz inhibitorok migrációs kinázokra gyakorolt hatása a Hs578T sejtvonalon.

A sejtkultúrákat 1.5 vagy 48 óráig kezeltük 1 μ M MPCD84111-el, SKI606-al vagy BMS777607-tel. A migrációs kinázok (Pyk2, FAK, Lyn, Src) és p130Cas állványfehérje foszforilációját Western blottal határoztuk meg.

Ezen eredmények összhangban vannak a korábban részletezettekkel és alátámasztják, hogy az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorok sejtmigráció gátló hatása annak köszönhető, hogy az AXL gátlása mellett a migrációs kinázok aktivitását is csökkentik. Továbbá egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a tripla negatív sejtvonalak migráció gátlásában sokkal célravezetőbb lehet többszörös, az AXL-t és a migrációs kinázokat is gátló inhibitoroknak a használata.



10. ábra. Az AXL tirozin kináz inhibitorok migrációs kinázokra gyakorolt hatása a BT549 sejtvonalon.

A sejteket 1.5 vagy 48 óráig kezeltük 1 μ M MPCD84111-el, SKI606-al vagy BMS777607-el. A migrációs kinázok (Pyk2, FAK, Lyn, Src) és p130Cas állványfehérje foszforilációját Western blottal határoztuk meg.

5.2. Az AXL tirozin kináz gátlásának hatásai AXL overexpresszált daganatos sejtvonalak receptor tirozin kináz foszforilációjára és expressziójára

5.2.1. Az AXL tirozin kináz gátlása előidézi a HER3 aktivációját és expresszióját

A daganatterápiában egy új paradigmának számít a molekuláris célpontok elleni célzott, személyre szabott terápia. Ez a terápia a daganatsejtek növekedéséért, túléléséért, migrációjáért felelős jelátviteli molekulák célzott gátlásán alapszik. Azonban ennek az új daganatkezelési módszernek a sikerességét árnyalja a szerrel szembeni rezisztencia kialakulása. Éppen ezért szükségszerűvé vált a rezisztencia okainak az ismerete ahhoz, hogy sikeresebben gátoljuk annak kialakulását.

Korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy az AXL tirozin kináz hozzájárul a célzott hatású molekulákkal szembeni rezisztenciához [108, 109, 113, 125].

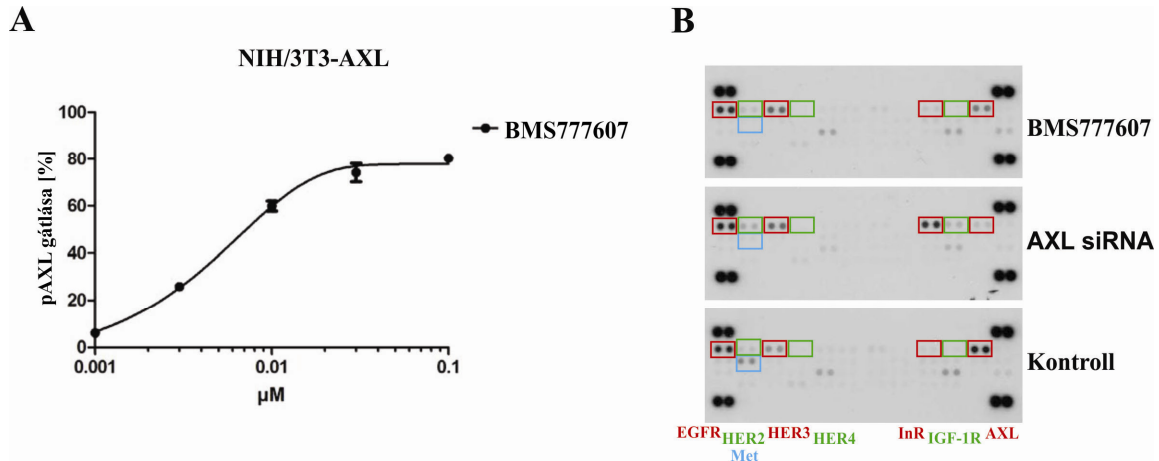
Mivel ezidáig nem tanulmányozták ezt a kérdést, célul tűztük ki, hogy ellenőrizzük az AXL gátlás hatásait a többi receptor tirozin kináz expressziójára illetve aktivációjára.

Ahhoz, hogy ezt megvalósítsuk, a korábbiakban ismertetett BMS777607 inhibitor AXL foszforiláció gátló képességét először NIH/3T3-AXL fibroblaszt sejteken vizsgáltuk ELISA segítségével (11 A ábra). Az NIH/3T3-AXL sejtvonal AXL cDNS transzfekció következtében nagy mennyiségben expresszálja az AXL fehérjét.

A további kísérleteinkhez viszont az AXL-t fiziológián expresszáló sejtvonalakat használtunk. A kiválasztott sejtvonalak közül az MDA-MB-231 volt a legfontosabb, mivel ennek a sejtvonalnak az agresszív képessége függ az AXL fehérje expressziójától [84, 98, 129].

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az AXL receptor tirozin kináz hatását a többi receptor tirozin kináz foszforilációjára, vagy siRNS-el csendesítettük az AXL fehérjét, vagy BMS777607

AXL inhibitorral gátoltuk az AXL kináz aktivitását. Ezek után receptor tirozin kináz array-vel mértük meg a receptor tirozin kinázok foszforilációját (11 B ábra).

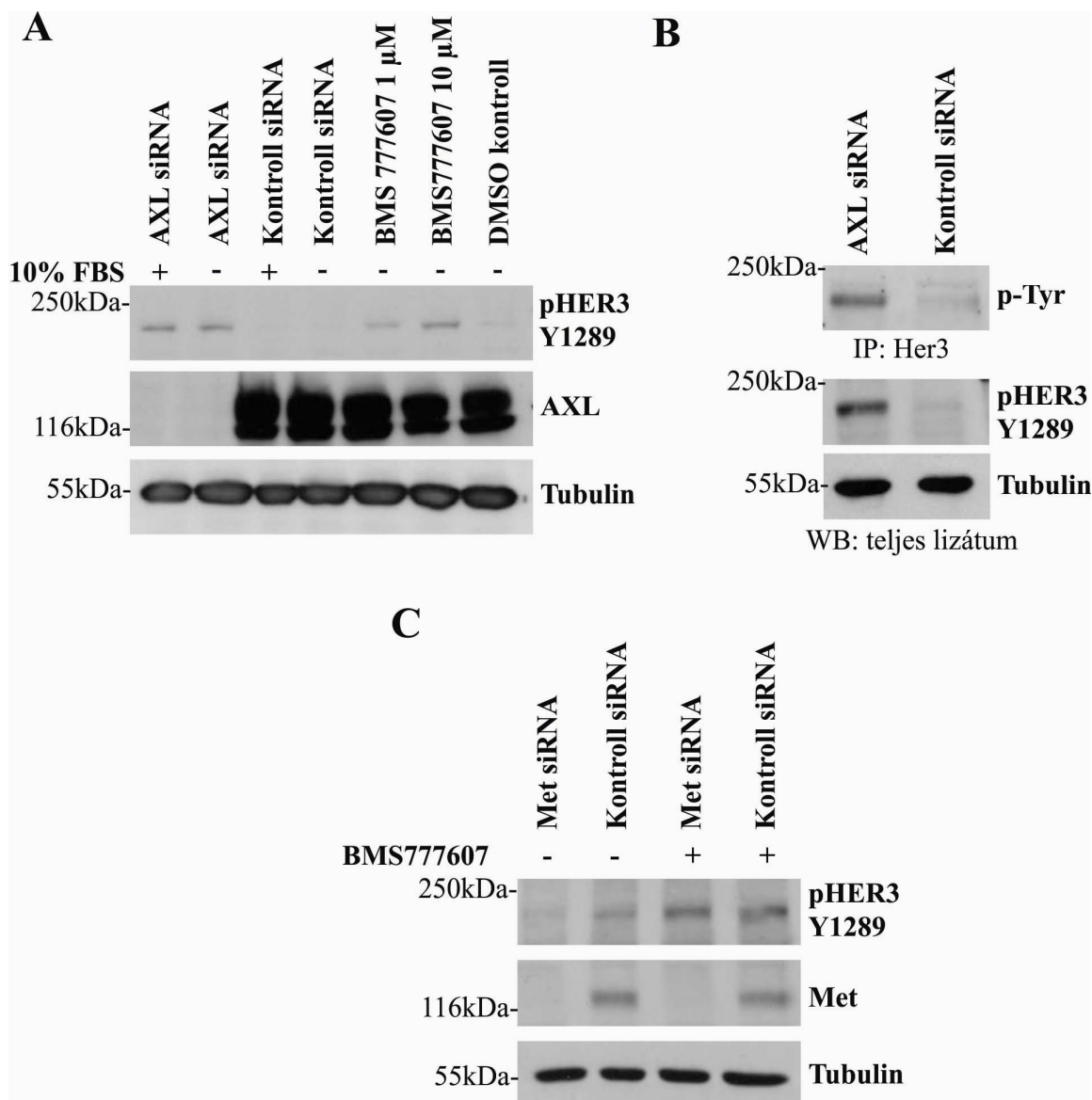


11. ábra. Az AXL tirozin kináz gátlása következtében a HER3 foszforilálódik

A BMS777607 AXL tirozin kináz foszforiláció gátló IC_{50} értékét NIH/3T3-AXL sejtvonalon határoztuk meg, ELISA segítségével (A). Az MDA-MB-231-es sejteket 24 óráig BMS777607 inhibitorral vagy AXL siRNS-el kezeltük, majd Foszfó- RTK Array kit segítségével ellenőriztük az AXL gátlás hatását a többi receptor tirozin kináz foszforilációjára (B).

24 órás, 1 μ M BMS777607 inhibitorral való kezelés következtében a kontroll membránhoz viszonyítva a vizsgált 42 receptor tirozin kináz közül az AXL és a Met aktivitása szignifikánsan lecsökkent, míg a HER3 foszforilációja erősödött (11 B ábra). Ezzel szemben a EGFR kináz család többi tagjának (EGFR, HER2 és HER4) a foszforilációja nem változott. Az AXL siRNS kezelés hatására az InsR, IGF-1R és ismét a HER3 foszforilációjának a szintje erősödött fel (11 B ábra). Az AXL gátlás utáni InsR és IGF-1R foszforilációjának a megerősödését Western blottos kísérletekkel nem sikerült alátámasztanunk. Az AXL kinázgátlás pozitív hatását a HER3 foszforilációra más módszerrel is ellenőrizni akartuk. Ezért az MDA-MB-231-es sejteket szérumos és szérummentes körülmények között AXL siRNS-el és BMS777607-el kezeltük, majd Western blottal megvizsgáltuk a HER3 foszforilációját. A szérumos (10% (v/v) FBS) és szérummentes (0% (v/v) FBS) körülményektől függetlenül a kontrollhoz képest az AXL siRNS-el kezelt sejtekben a HER3 Y1289 foszforilációja megerősödött (12 A ábra).

Hasonlóan az AXL siRNS kezeléshez, az 1 μ M és 10 μ M BMS777607 inhibitorral való 24 órás inkubáció után is látható volt a HER3 foszfo-Y1289 indukciója az MDA-MB-231 sejtekben (12 A ábra). Az anti-HER3 antitesttel végzett immunoprecipitációs kísérleteket siRNS-el transzfektált MDA-MB-231 sejtek lizátumából végeztük, míg a HER3 tirozin foszforilációját a Max Planck Intézet foszfo-Tyr antitestével detektáltuk. A HER3 aktivációjáért felelős tirozin oldallánc foszforilációját (HER3 foszfo-Y1289) Western blottal validáltuk. Mivel az AXL-hez kötődő egyik fontos jelátviteli molekula, a PI3K főképpen ehhez a tirozin oldallánchoz kötődik [130], ezért a kísérleteinkhez ezt az antitestet használtuk. Az immunoprecipitációs vizsgálatok megerősítették a fentiekben ismertetett kísérletek eredményeit, mivel az AXL géncsendesítés következtében a HER3 foszforilációja szignifikánsan megerősödött (12 B ábra).



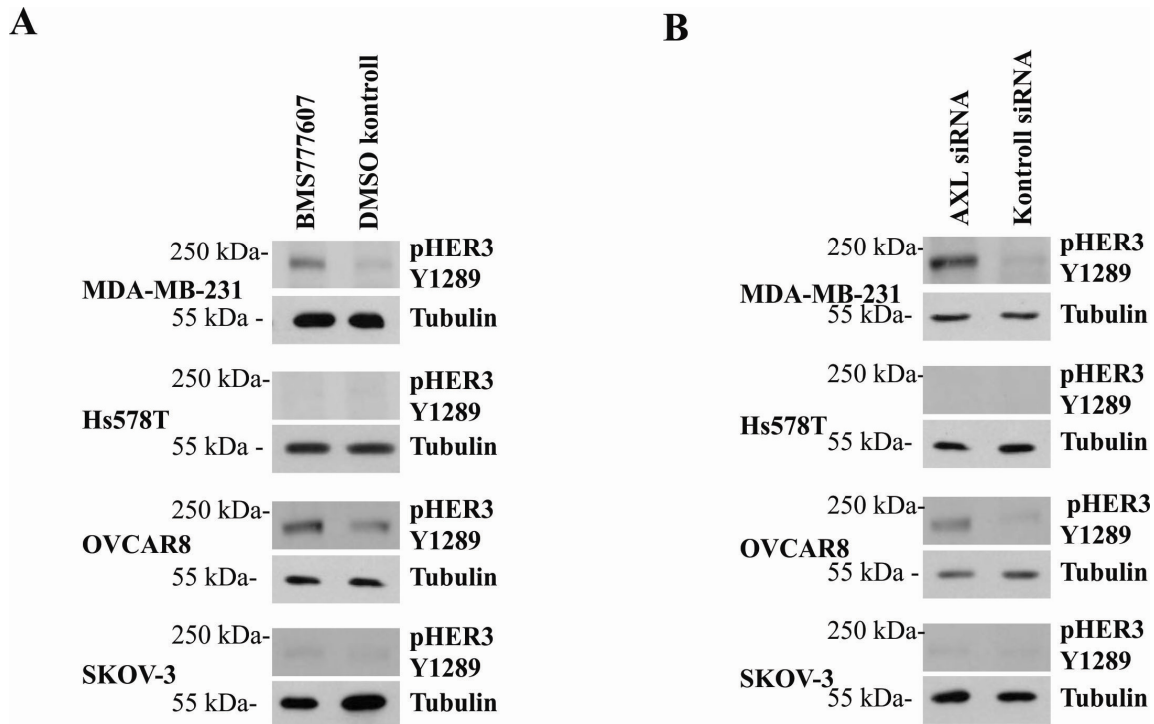
12. ábra. Az AXL tirozin kináz gátlása következtében indukálódott foszfo HER3 validálása

Az MDA-MB-231-es sejteket AXL siRNS-el vagy 1 és 10 μ M BMS777607-el kezeltük, majd Western blottal validáltuk a HER3 foszforilációját (A). Az AXL siRNS-el kezelt MDA-MB-231 sejtek foszfo-HER3 tartalmát HER3 specifikus (Millipore, # 05—390) és foszfo-Y1289 HER3 antitesttel tettük láthatóvá (B). A c-Met hatását a HER3 foszforilációjára Met specifikus siRNS-el és 10 μ M BMS777607-el ellenőriztük (C).

Mivel a BMS777607 inhibitor elsősorban Met kináz inhibitoraként közismert, ezért fontosnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk a Met fehérje hatását a HER3 foszforilációjára. E célból az MDA-MB-231 sejteket magában Met specifikus siRNS-el vagy 10 μ M BMS777607-el kombinációban kezeltük (12 C ábra). A Met siRNS-el vagy a BMS777607 inhibitorral kombinációban kezelt sejtekben a Met fehérjének a hiánya nem okozott változást a HER3 foszforilációjában, míg a 10 μ M BMS777607-el kezelt sejtekben a HER3 foszforilációja megnövekedett (12 C ábra). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a Met fehérje nem befolyásolja a HER3 foszforilációját.

5.2.2. A HER3 foszforilációjának az erősödése az alacsony AKT foszfo -S473 mennyiséggel korrelál

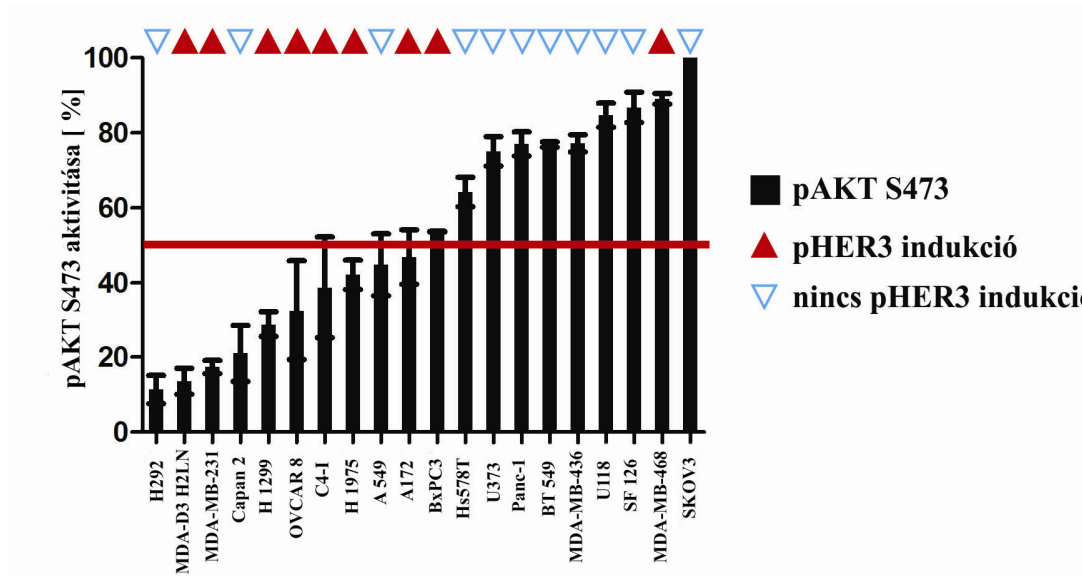
Kíváncsiak voltunk arra, hogy az előző részben ismertetett HER3 feedback mechanizmus jellemző-e minden AXL overexpresszióval rendelkező daganatos sejtvonalra. Hogy erről megbizonyosodjunk, első körben kiválasztottuk két olyan petefészek (OVCAR8, SCOV-3) és két emlő (MDA-MB-231, Hs578T) sejtvonalat amelyek AXL overexpresszióval rendelkeznek. Ahhoz, hogy az AXL aktivitását legátoljuk, a sejteket 10 μ M BMS777607-tel (13 A ábra) vagy siRNS-sel (13 B ábra) kezeltük, majd Western blottal ellenőriztük a HER3 foszforiláltságát. Az MDA-MB-231 és OVCAR8 sejtekben mindkét kezelési mód következtében foszforilálódott a HER3, viszont a Hs578T és SCOV-3 sejtekben a HER3 foszforilációja nem volt látható (13 ábra). Ezen eredmények alapján, arra következtetünk, hogy az AXL expressziója nem feltétlenül prediktálja HER3 feedback mechanizmust.



13. ábra. Az AXL overexpresszióval rendelkező sejtvonalaknak, az AXL gátlásra adott válasza különböző

Az MDA-MB-231, Hs578T, OVCAR8 és SKOV-3 sejteket 10 μ M BMS777607-el (A) vagy AXL siRNS-el (B) kezeltük, majd Western blottos kísérletekkel ellenőriztük a HER3 kináz foszfo-Y1289 foszforilációját.

Hogy tovább jellemezzük a HER3 aktiváció mechanizmusának az okait, 20 különböző szöveti eredetű (glioma, emlő, petefészek, méhnyakrák, tüdő és hasnyálmirigy) sejtvonalat választottunk ki, amelyek overexpresszálták az AXL tirozin kináz receptort. Mivel az PI3K/AKT jeltovábbítási útvonalat befolyásolja az AXL tirozin kináz receptor [70], ezért AKT foszfo-S473 ELISA-val meghatároztuk a sejtvonalak AKT foszforilációs szintjét. A sejtvonalak AKT foszfo-S473 státuszát növekvő sorrendben mutatja 14-es ábra abszcissa (X) tengelye. Ezzel a kísérlettel párhuzamosan Western blottal is megvizsgáltuk az AXL siRNS-el és BMS777607 inhibitorral kezelt sejtvonalak HER3 aktivációját (14. ábra)



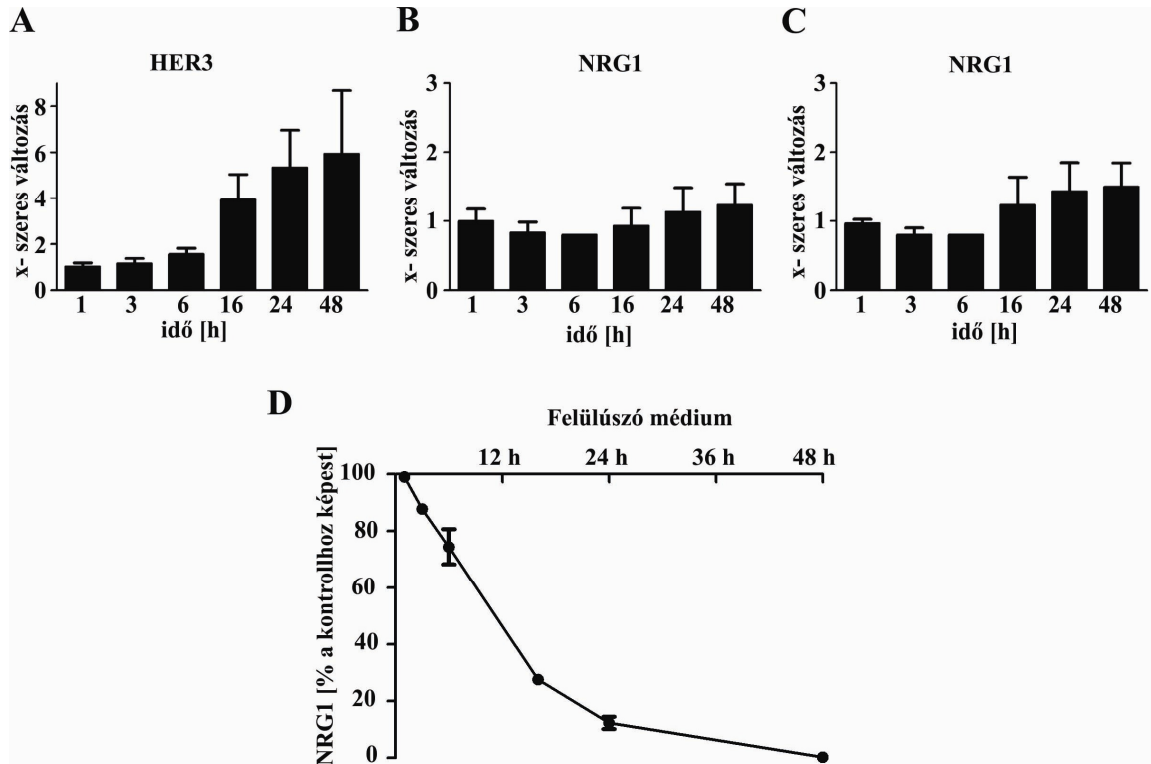
14. ábra. Az AXL overexpresszióval rendelkező, különböző eredetű daganatos sejtvonalak HER3 foszforilációja alacsony AKT foszfo-S473 szinttel korrelál.

A sejtvonalak AKT foszfo-S473 szintjét ELISA-val, míg foszfo-HER3 indukcióját az AXL specifikus siRNS-el való csendesítést vagy a 10 μ M BMS777607 kezelést követően Western blottal határoztuk meg. Piros háromszög jelöli azokat a sejtvonalakat, amelyek az AXL gátlása következtében indukálták a HER3-at, a kék háromszög pedig azokat a sejtvonalakat jelöli, amelyekben a kezelés hatására nem foszforilálódott a HER3.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy létezik egy pozitív korreláció az alacsony AKT foszfo-S473 szint és az AXL gátlás hatására bekövetkező HER3 aktiváció között. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény, hogy az alacsony AKT foszfo-S473 szinttel rendelkező 10 sejtvonal közül hét, míg a magas AKT foszfo-S473 szinttel rendelkező sejtvonalak közül két sejtvonal aktiválta az AXL gátlása után a HER3 receptort. Következésképpen elmondhatjuk, hogy az AXL overexpresszió és az alacsony AKT foszfo-S473 szint prediktálja a HER3 feedback mechanizmust.

5.2.3. Az AXL tirozin kináz receptor gátlása aktiválja a HER3 transzkripcióját

A következő lépésben szeretnénk tisztázni, hogy a HER3 foszforilációja függ-e a HER3 transzkripciójától. Ahhoz, hogy ellenőrizzük a HER3 transzkripció szintjét, az MDA-MB-231 sejteket 10 μ M koncentrációjú BMS777607-el kezeltük. A kezelt sejteket különböző időpontokban lizáltuk, majd kvantitatív PCR-el megmértük a HER3 mRNS szintjüket. A kontrollhoz képest az első szignifikáns, 3,9-szeres HER3 mRNS indukció már 16 órás kezelés után megfigyelhető volt (15 A ábra). A maximális, 5,9-szeres HER3 mRNS növekedést 48 óráig kezelt sejtek lizátumában mértünk (15 A ábra).



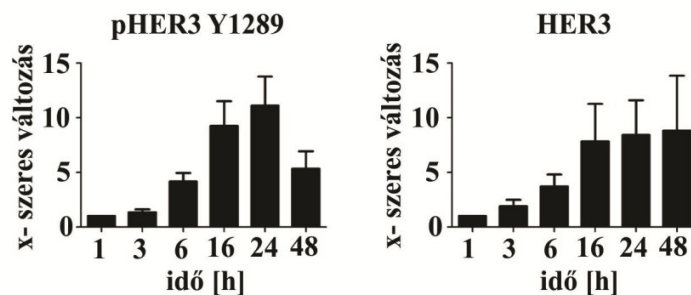
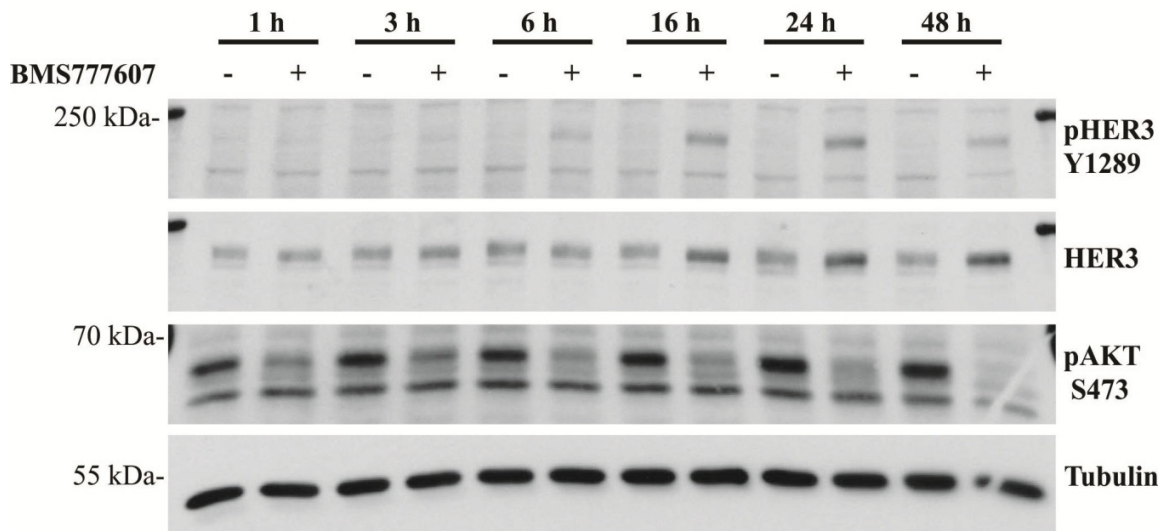
15. ábra. Az AXL tirozin kináz gátlása aktiválja a HER3 transzkripcióját és a HER3 foszforilációja a NRG1 csökkenésével korrelál.

Az MDA-MB-231 sejtek 1-48 óráig 10 μ M BMS777607-el voltak kezelve. Az így kapott lizátumokból kvantitatív real time PCR-el határoztuk meg a HER3 (A) és a NRG1 (első primer pár-B ábra, második primer pár-C ábra) mRNS szintjét. Az 1-48 óráig 10 μ M BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtek felülúszó médiumából az NRG1 fehérje mennyiségét NRG1 ELISA-val határoztuk meg (D)

Irodalmi adatokból ismert, hogy emlődaganatos sejtek gyakran ErbB receptorokat aktiváló neuregulin ligandokat termelnek [131], ezért a BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtek lizátumában PCR-el és ELISA-val ellenőriztük az NRG1 mennyiségét mRNS és fehérje szinten. Az NCBI adatbázisa alapján jelenleg 17 különböző humán NRG1 izoforma ismert. Mivel a NRG1 a sejtekben különböző izoformákban van jelen, ezért két különböző primer párt használtunk a kvantitatív PCR-hez. Az első primer pár a #2 és a #14 izoforma kivételével, míg a második primer pár a #2, #15 és #17 izoforma kivételével az összes

ismert humán NRG1 mRNS-hez képes volt kötődni. Ezzel a két primer párral tehát a #2 izoformát kivéve lefedtük az összes számon tartott NRG1 izoformát.

Az MDA-MB-231 sejtekben az NRG1 mRNS expressziója dektektálható volt, de az indukció mértéke 1,2-szeres és 1,5-szörös értékek között mozgott (15 B, C). Mivel ezek az értékek nagyon alacsonyak voltak, kizártuk annak a lehetőségét, hogy az NRG1 mRNS indukciója lenne felelős a HER3 aktivációjáért. Érdekes módon a BMS777607 inhibitorral kezelt MDA-MB-231 sejtek felülúszó médiumában a kontroll sejtekhez viszonyítva szignifikánsan csökkent az NRG1 fehérje mennyisége (15 D).



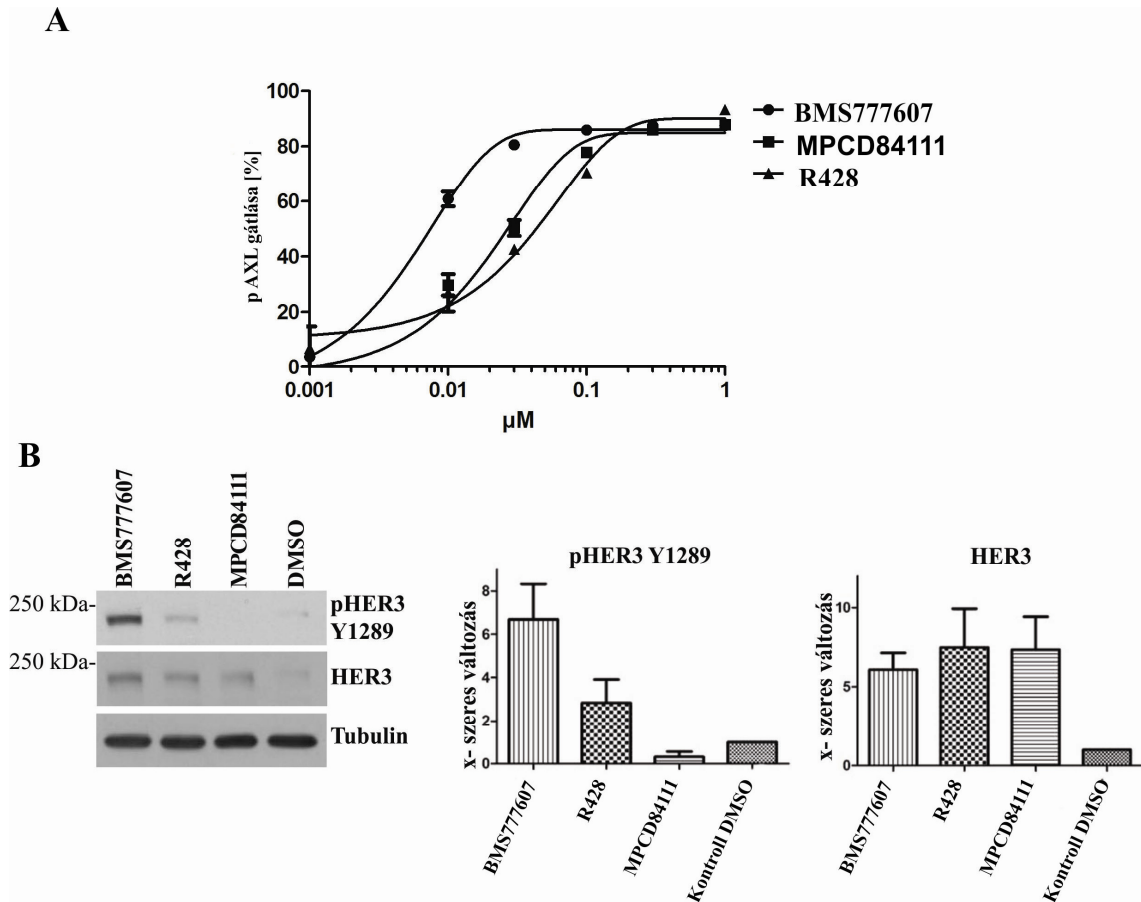
16. ábra. A HER3 foszforilációja független a HER3 fehérje expressziójától.

1 órától 48 óráig 10 μ M BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtvonalban a foszfo-HER3, foszfo-AKT és totál HER3 időbeni változásait Western blottal ellenőriztük.

Ahhoz, hogy ellenőrizzük, van-e kapcsolat a NRG1 ligand csökkenése és a HER3 aktivációja között, az MDA-MB-231-es sejteket különböző időpontokban kezeltük 10 μ M BMS777607-el, majd Western blottal megvizsgáltuk a HER3 Y1289 foszforiláltságát (16 ábra). A fentiekben leírt eredményekhez hasonlóan a BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtekben már 6 óra inkubáció után aktiválódik a HER3 receptor és ez aktiváció szorosan összefügg a felülúszó médium NRG1 ligand koncentrációjának csökkenésével (15 D ábra). Ezzel szemben a HER3 expressziója a kontroll sejtekhez viszonyítva csak 16 órás kezelés után emelkedett meg szignifikánsan. Ebből az eredményből arra következtetünk, hogy a HER3 foszforilációja független a HER3 fehérje expressziójától. A legerősebb foszfo-HER3 jelet a 24 óráig kezelt sejtek lizátumában detektáltuk (16 ábra). Habár irodalmi adatok arra utalnak, hogy a HER3 aktivációja stimulálja az AKT aktivációját is, a mi kísérleteinkben a HER3 aktivációja nem okozott semmilyen változást az AKT S473 foszforilációjában, még 48 óra BMS777607 kezelés után sem. Ugyanakkor az AKT inhibíciója indukálta a HER3 fehérjének az expresszióját, ami egyezést mutat a korábban publikált mechanizmussal [132, 133].

5.2.4. Az MPCD84111 gátolja a HER3 feedback mechanizmusát

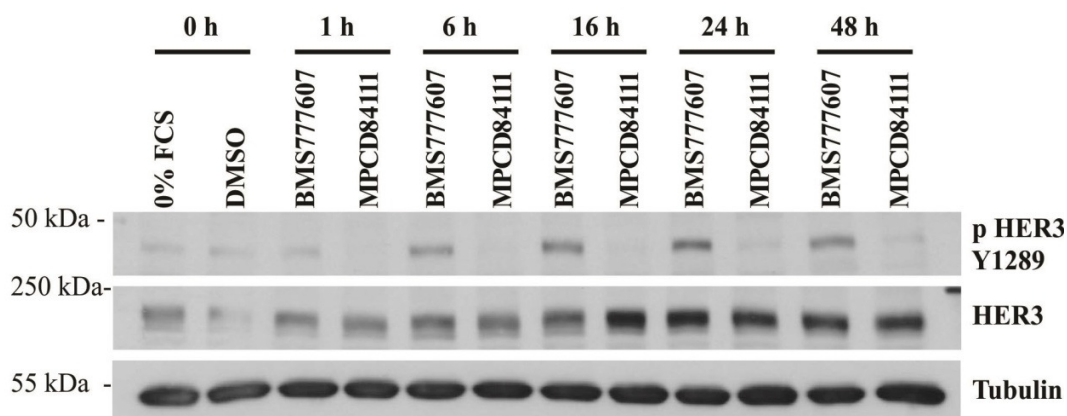
Mivel a BMS777607 által indukált HER3 aktivációt számos kísérlettel bizonyítottuk, kíváncsiak voltuk arra, hogy jellemző-e ez a jelenség a többi AXL inhibitorra is. Először a korábban már vizsgált MPCD84111, a jól ismert AXL inhibitor R428 [97] és a BMS777607 AXL foszforilációjára gyakorolt hatását AXL ELISA segítségével NIH/3T3-AXL sejtvonalban validáltuk. Ahogy a 17 A ábra is mutatja, mindhárom inhibitor nanomoláris koncentrációban gátolta a AXL foszforilációját.



17. ábra. Hasonló hatékonyságú AXL inhibitorok hasonló mértékben növelik HER3 szintjét, de különbözőképp a foszforiláltságát.

Az AXL inhibitorok AXL foszforiláció gátlását NIH/3T3-AXL sejtvonalon ELISA-val határoztuk meg (A). A 10 μM BMS777607-el, R428-al és MPCD84111-el kezelt sejtek foszfo-HER3 és teljes HER3 szintjét Western blottal vizsgáltuk meg (B). A diagramok a Western blot sávok erősségét ábrázolják.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy ezen AXL inhibitorok milyen hatással vannak a HER3 foszforilációjára. A vártan megfelelően a BMS777607-el történt kezelés hatására a HER3 foszforilálódott (17 B ábra). Hasonló indukciót váltott ki az R428 inhibitor is, míg az MPCD84111 csak kis mértékben gátolta a HER3 foszforilációját (17 B ábra). Ugyanakkor a HER3 transzkripcióját mind a három inhibitor előidézte, mivel a HER3 fehérje mennyisége minden mintában megnövekedett (17 B ábra).



18. ábra Az MPCD84111 gátolja a HER3 foszforilációját

Az 1 μ M BMS777607-el vagy 1 μ M MPCD84111-el különböző időpontban kezelt MDA-MB-231 sejtek HER3 foszforilációját illetve a HER3 fehérjének az expresszióját Western blottal ellenőriztük.

Hogy alátámasszuk ezt az eredményt, az MDA-MB-231 sejteket különböző időpontokban kezeltük 1 μ M BMS777607 vagy MPCD84111 inhibitorral, majd Western blottal ellenőriztük a HER3 fehérje foszforilációját és mennyiségi változásait. A fentiekben leírt eredményekkel összhangban a 48 óráig MPCD84111-el kezelt MDA-MB-231 sejtekben a HER3 nem aktiválódott, viszont a BMS777607-el kezelt sejtekhez hasonlóan a HER3 fehérje mennyisége megnőtt (18 ábra). Irodalmi adatokból ismert, hogy az AKT inhibíciója hatással van a FoxO család tagjainak expressziójára [134], ezért valószínűleg a BMS777607 és MPCD84111 inhibitorok AKT gátlása következtében transzlokálódó FoxO fehérjék felelősek a HER3 fehérje megnövekedett transzkripciójáért.

5.2.5. Az MPCD84111 inhibitor gátolja a HER3 lehetséges dimerizációs partnerét, a HER2 receptort

Szerettük volna megérteni, hogy az MPCD84111 a BMS777607 inhibitorral ellentétben miért képes a HER3 indukcióját gátolni.

Ismert, hogy a HER3 receptor csak más epidermális növekedési faktor receptorokkal, elsősorban az ErbB2-vel (HER2) vagy az ErbB1-el (EGFR) heterodimert alkotva képes aktiválódni [135].

Mivel a korábbi enzimaktivitás mérésben nem vizsgáltuk az MPCD84111 hatását a HER2 receptor aktivitására, ezért egy fluoreszcencia alapú polarizációs assay-vel egészítettük ki az MPCD84111 kinázgátlás profilját. Az eredmények alátámasztották a korábbi részben ismertetett MPCD84111 célpont arzenálját, továbbá rámutattak az inhibitor HER2 receptor gátlási képességére is (Függelék 2-es ábra). Schroeder és munkatársai 2009-es [126] publikációjából tudtuk, hogy a BMS777607 nem gátolja a HER2 receptort, ebből az adatból kiindulva, arra a következtetésre jutottunk, hogy az MPCD84111 inhibitor valószínűleg a HER2 receptor gátlása révén akadályozza meg a HER3 receptor aktiválódását.

A fentiekben ismertetett eredményeket, a HER2 receptort expresszáló MCF7 sejtvonalon végzett kísérletek is alátámasztották, ugyanis ellentétben a BMS777607 inhibitorral, az MPCD84111 inhibitor gátolta a HER2 foszforilációját (19 A ábra).

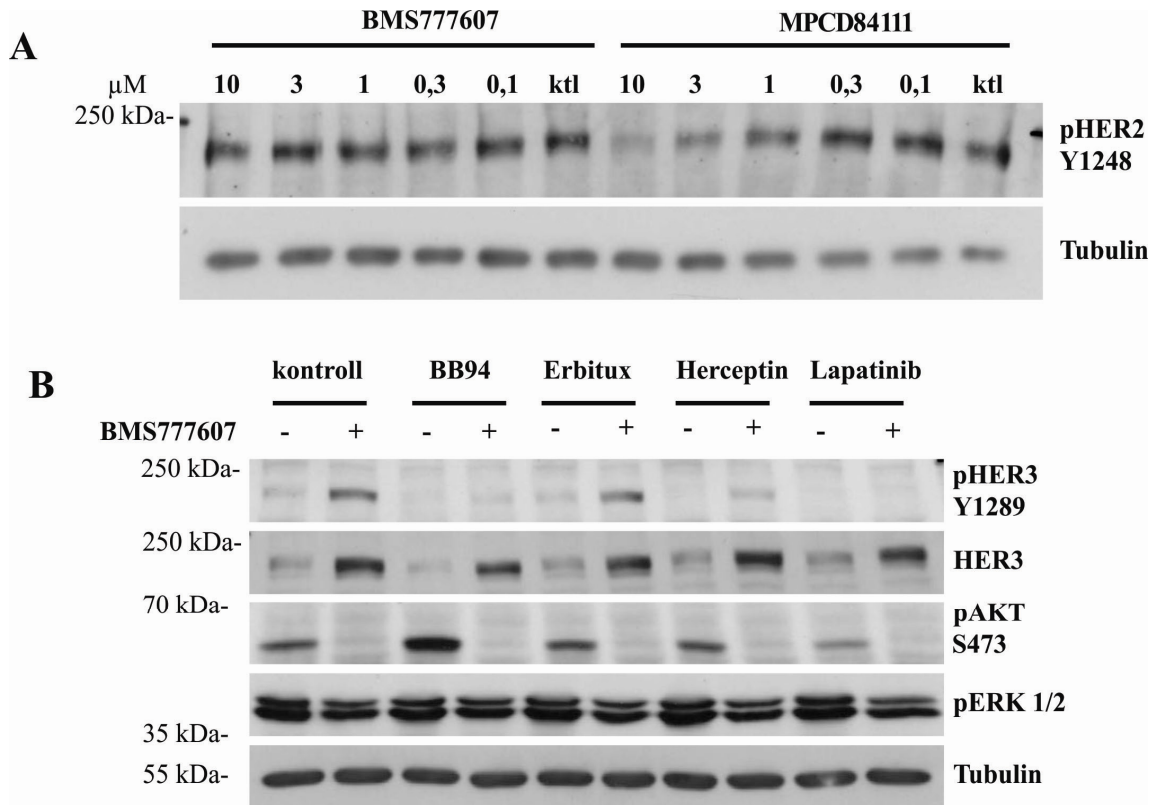
5.2.6. A HER3 még a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakban is a HER2-vel dimerizálódik

Mivel a HER3 receptor csak heterodimer szerkezetben tud aktiválódni, ezért célul tűztük ki, hogy megkeressük a dimerizációs partnerét.

Korábbi irodalmi adatokból tudtuk, hogy a HER3 elsődlegesen a HER2 receptorral dimerizálódik, ezért annak ellenére, hogy az MDA-MB-231 tripla negatív emlődaganat sejtvonal csak csekély mértékben expresszálja a HER2 receptort, azt feltételeztük, hogy ebben a sejtvonalban is a HER2-vel dimerizálódik a HER3.

Hogy hipotézisünket bebizonyítsuk, az MDA-MB-231 sejteket BMS777607 inhibitorral előinkubáltuk, majd Batimastat-al (BB-94, mátrix metalloproteináz gátló), Erbitux-al (anti-EGFR monoklonális ellenanyag), Herceptinnel (az FDA által jóváhagyott HER2 blokkoló monoklonális antitest), vagy Lapatinibbel (kismolekulás EGFR/HER2 tirozin kináz gátló)

kezeltük (19 B ábra). Az Erbitux kezelést kivéve mindegyik kombinációs kezelés gátolta a HER3 aktivációját (19 B ábra).



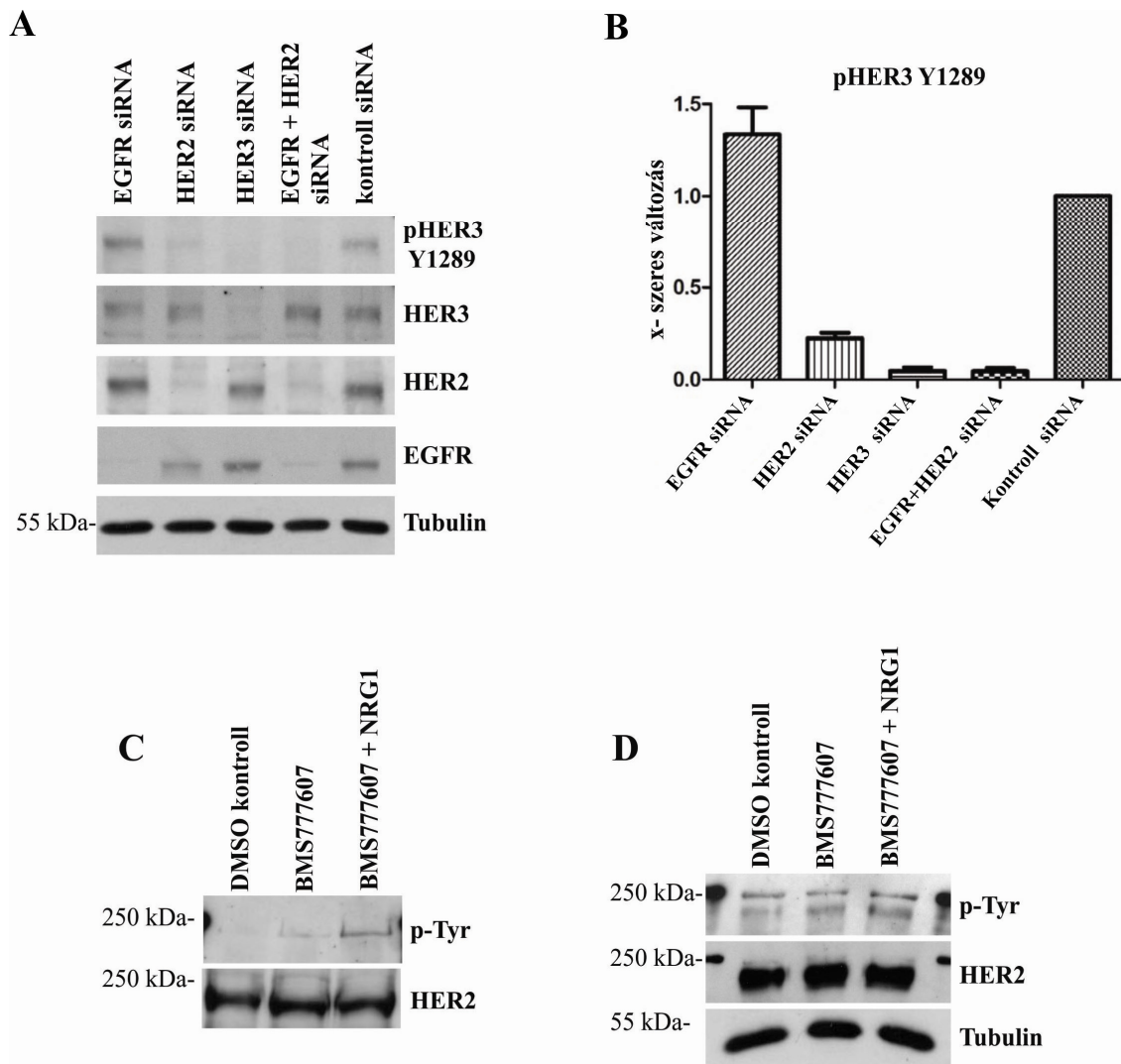
19. ábra. Tripla negatív emlődaganatos sejtvonalban a foszfo-HER2 gátlása megakadályozza a HER3 foszforilációját.

Az MPCD84111 HER2 gátlását HER2-t expresszáló MCF7 sejtvonalban validáltuk. A sejteket különböző koncentrációjú MPCD84111-el vagy BMS777607-el 1 óráig inkubáltuk. A HER2 foszforilációját Western blottal ellenőriztük (A). Az MDA-MB-231 sejteket 10 μM BMS777607-el vagy DMSO-val 24 óráig előinkubáltuk, majd 5 μM Batimastattal (BB-94), 10 $\mu\text{g/ml}$ Erbituxal, 10 $\mu\text{g/ml}$ Hereceptinnel vagy 5 μM Lapatinibbel további 2 óráig kezeltük. A HER3, AKT és ERK 1/2 foszforilációját és a HER3 fehérje expressziós szintjét Western blottal mutattuk ki (B).

A Herceptinnel és a Lapatinibbal kezelt sejtek lizátumaiból kapott eredmények arra utaltak, hogy MDA-MB-231 sejtekben a HER2 fontos szerepet játszik az HER3 aktivációjában (19 B ábra).

Irodalmi adatokból ismert, hogy az EGFR család tagjainak a ligandjai csak azután kerülnek ki a sejtfelszínre miután a metalloproteinázok proteolitikusan hasították őket [136]. A BB-94 inhibitor gátolja az ADAM család metalloproteinázait, ezáltal megakadályozva az EGFR ligandok proteolitikus hasítását [137, 138]. Ahogy a 19 B ábra is mutatja, a BB-94 inhibitor gátolta a foszfo-HER3-at, ami alátámasztja korábbi feltételezésünket, hogy a HER3 extracelluláris mechanizmus révén aktiválódik.

A Lapatinib EGFR/HER2 kettős gátlóként közismert, ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy az EGFR vagy a HER2 receptor gátlása révén gátolja-e a foszfo-HER3-at. Éppen ezért specifikus EGFR, HER2, HER3 illetve EGFR/HER2 kombinációs siRNS kezelésekkel csendesítettük a célfehérjéket, majd 48 óra inkubációt követően a sejteket további 24 óráig DMSO-val vagy 10 μ M BMS777607-el kezeltük.



20. ábra. Az EGFR és HER2 fehérjék kombinációs géncsendesítése teljesen legátolja a HER3 foszforilációját.

MDA-MB-231-es sejteket EGFR, HER2, HER3, EGFR/HER2 és kontroll siRNS-ekkel kezeltük, majd 48 óra elteltével további 24 órát 10 μ M BMS777607-el inkubáltuk. Az siRNS kezelés validálását és a HER3 foszforilációját Western blottal (A), míg a fehérje sávok erősségét densitometriás analízissel ellenőriztük. A 10 μ M BMS777607-el vagy 10 μ M BMS777607-e kezelt és 50 ng/ml NRG1-el indukált MDA-MB-231 sejtek foszfo-HER2 tartalmát HER2 specifikus Millipore (# 06-562 -C ábra) vagy Max Planck Intézetben előállított HER2 specifikus (13D1B1 -D ábra) antitestekkel való immunoprecipitációval

határoztuk meg. A C és D ábrákon a HER2 antitestekkel immunoprecipitált minták foszfo-tirozin és totál HER2 szintje látható.

Meglepő módon a HER3 foszforilációját leghatékonyabban a HER3 siRNS csendesítésén kívül az EGFR/HER2 kombinációs siRNS csendesítés gátolta (20 A, B ábra). Hasonlóan a Herceptin kezeléshez, a HER2 siRNS csendesítést követően is körülbelül 22%-os volt a HER3 foszforiláltsága (20 A, B ábra).

Hogy tisztázzuk a HER2 foszforilációját a tripla negatív MDA-MB-231 sejtvonalban, az MDA-MB-231 sejteket 24 óráig 10 μ M-os BMS777607 inhibitorral kezeltük, majd 50 ng/ml NGR1 liganddal tovább erősítettük a HER3 foszforilációját. Az így kezelt sejtek lizátumából 2 mg fehérjét tartalmazó mintát a Max Planck Intézetben előállított HER2 (clone 13D1B1) vagy a Millipore (Millipore #06-562) anti-HER2 ellenanyaggal immunoprecipitáltunk.

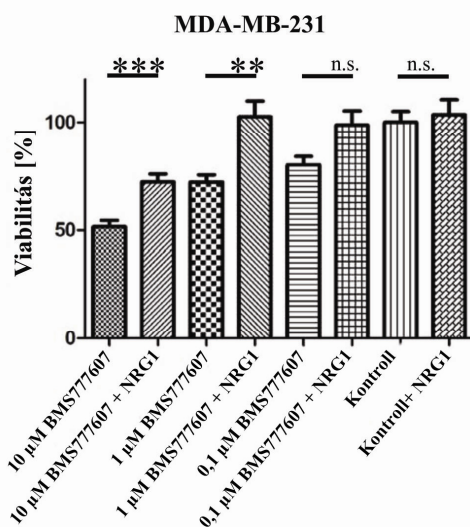
Az, hogy a nagy mennyiségű fehérjét tartalmazó mintából is csak csekély mértékben tudtuk kimutatni a HER2 foszforilációját, azt bizonyítja, hogy a HER3 aktivációjához elengedhetetlen a HER2 receptor jelenléte (20 C, D ábra)

5.2.7. NRG1 helyreállítja a sejtek viabilitását és az AKT foszforilációját

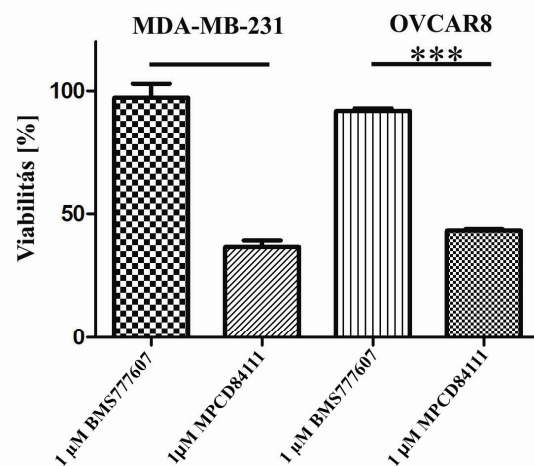
Annak ellenére, hogy a BMS777607 által indukált HER3 foszforilációja és expressziója nem állította helyre a BMS777607 által legátolt AKT S473 foszforilációját, a korábbiakban bemutatott eredmények alapján arra következtetünk, hogy az MDA-MB-231 sejtekben az AXL gátlás következményeként aktiválódott a HER3. Feltételeztük, hogy a HER3 a sejtek proliferációs és túlélési jelútvonalainak a fenntartásához szükséges, ezáltal csökkentve az AXL inhibitorok hatását. Hogy ezt a feltételezésünket bebizonyítsuk, az MDA-MB-231 sejteket szérummentes körülmények között 72 óráig BMS777607-el kezeltük, majd 15 percig 50 ng/ml NRG1-el stimuláltuk. Az ebből a kísérletből kapott eredmény alátámasztotta hipotézisünket, miszerint a HER3 foszforilációja fontos szerepet tölt be a

sejtek viabilitásában, ugyanis a NRG1-el kezelt sejtek kompenzálták a 0,1 μM és 1 μM BMS777607 által legátolt sejtviabilitást (21 A ábra). Ezen eredmény alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy kombinált AXL és HER2/HER3 kezelés szükséges ahhoz, hogy az AXL kináz gátlás következtében indukált HER3 expressziót és foszforilációt megakadályozzuk.

A



B

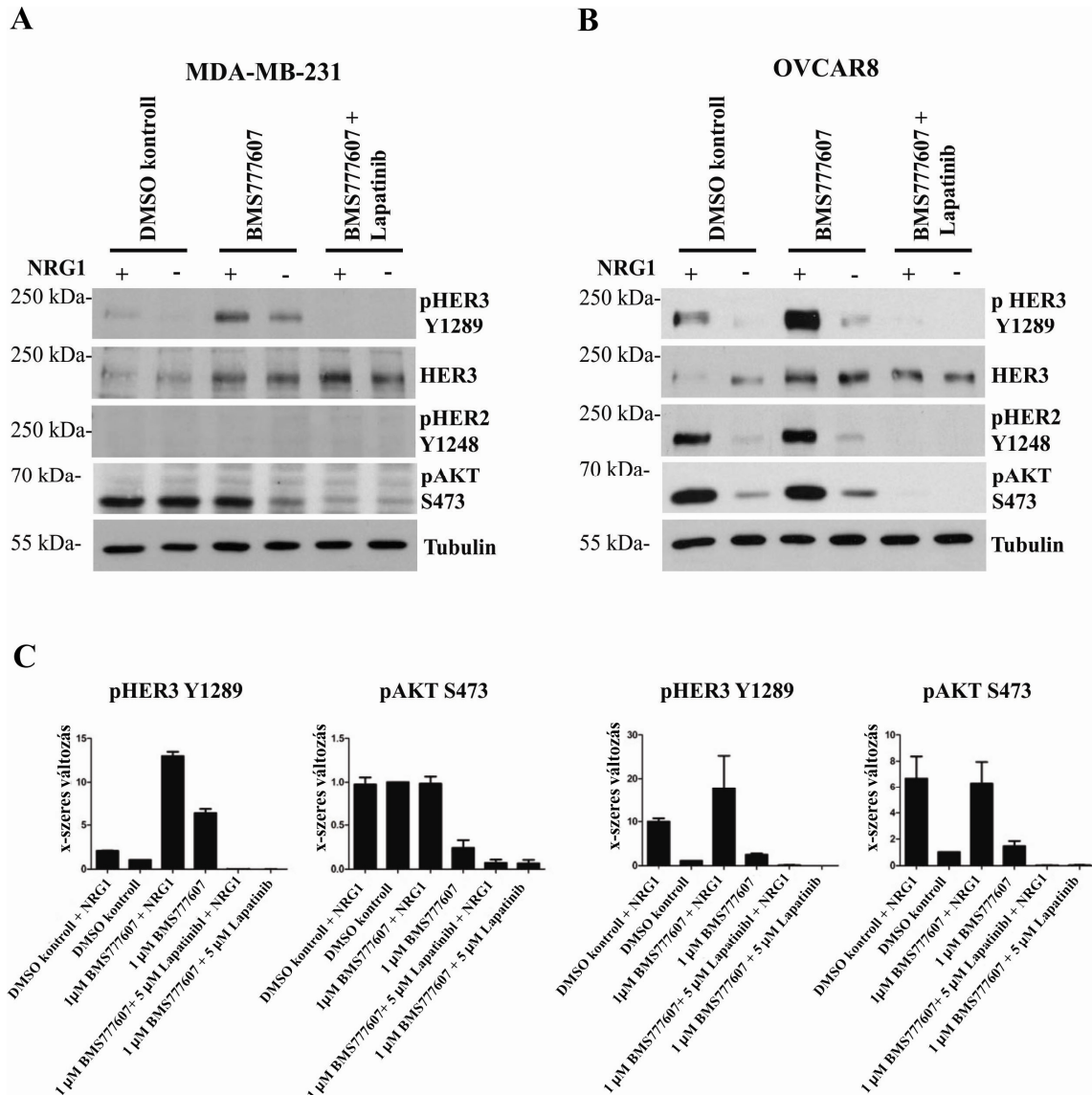


21. ábra. A NRG1 visszállítja a BMS777607-el kezelt sejtek viabilitását, míg az MPCD84111 gátolja az MDA-MB-231 és OVCAR8 szferoidok viabilitását.

Az MDA-MB-231 sejteket különböző koncentrációjú BMS777607-el vagy BMS777607 és 50 g/ml NRG1 kombinációjával kezeltük (A). Az MDA-MB-231 és OVCAR8 3D sejt-szferoidokat 1 μM BMS777607-el vagy 1 μM MPCD84111-el kezeltük. A sejtek viabilitását 72 órás inkubációt követően CellTiter Glo assay-vel mértük meg (B). Szignifikánsnak a $*=p<0,005$, $**=p<0,01$ és $***=p<0,001$ különbségeket tekintettük (Mann Whitney teszt, n.s. = nem szignifikáns).

Mivel az egyrétegű sejt-kultúra nem modellezi megfelelően az daganat in vivo biológiai körülményeit, ezért a sejtviabilitás további tanulmányozásához 3D szferoid kultúrát használtunk.

Ahhoz, hogy további bizonyítékokkal alátámasszuk a hipotézisünket, az MDA-MB-231 sejtvonal mellé még egy AXL overexpresszióval rendelkező petefészek eredetű sejtvonalat is választottunk, az OVCAR8-at. Először megvizsgáltuk az MPCD84111 és a BMS777607 hatását a sejtek viabilitására. A vártnak megfelelően, a kontroll szferoidokhoz viszonyítva az MPCD84111-el kezelt MDA-MB-231 sejtek szferoidjainak viabilitás aránya 37%, míg az OVCAR8 sejteké 42% volt (21 B ábra). Ezzel szemben a kontroll szferoidokhoz viszonyítva a BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtek szferoidjainak viabilitás aránya 97%, míg az OVCAR8 sejteké 92% volt (21 B ábra). Ahhoz, hogy teljesen legátoljuk a sejtek HER3 foszforilációját, a sejteket 24 óráig 1 μ M BMS777607-el vagy 5 μ M Lapatinibbel kombinálva kezeltük. Az 1 μ M BMS777607 következtében az MDA-MB-231 sejtekben a DMSO kontroll sejtekhez képest szignifikánsan megnövekedett a HER3 fehérje expressziója és foszforilációja, míg az AKT foszfo-S473 mennyisége 24%-al lecsökkent (22 A, C ábra). Az AKT foszfo-S473 szintjét a NRG1-el való stimuláció visszaállította a DMSO kontroll sejtekben mért szintre (22 A, C ábra). Az 1 μ M BMS777607-el és 5 μ M Lapatinibbel való kombinációs kezelések az 1 μ M BMS777607-el kezelt sejtekhez képest a HER3 és AKT foszforilációját 0,9%-al illetve 6,1%-al csökkentették csak le (22 A, C ábra). Az MDA-MB-231-es sejtekben az 1 μ M BMS777607-el és DMSO-val kezelt kontroll sejtekhez képest a NRG1 liganddal való stimuláció erőteljesen indukálta a HER3 foszforilációját (22 A, C ábra). Az MDA-MB-231 sejtekben az alacsony expressziós szint miatt a HER2 foszforilációja nem volt detektálható (22 A, C ábra).



22. ábra. BMS777607 és Lapatinib egymást erősítve gátolja az MDA-MB-231 és OVCAR8 sejtek viabilitását

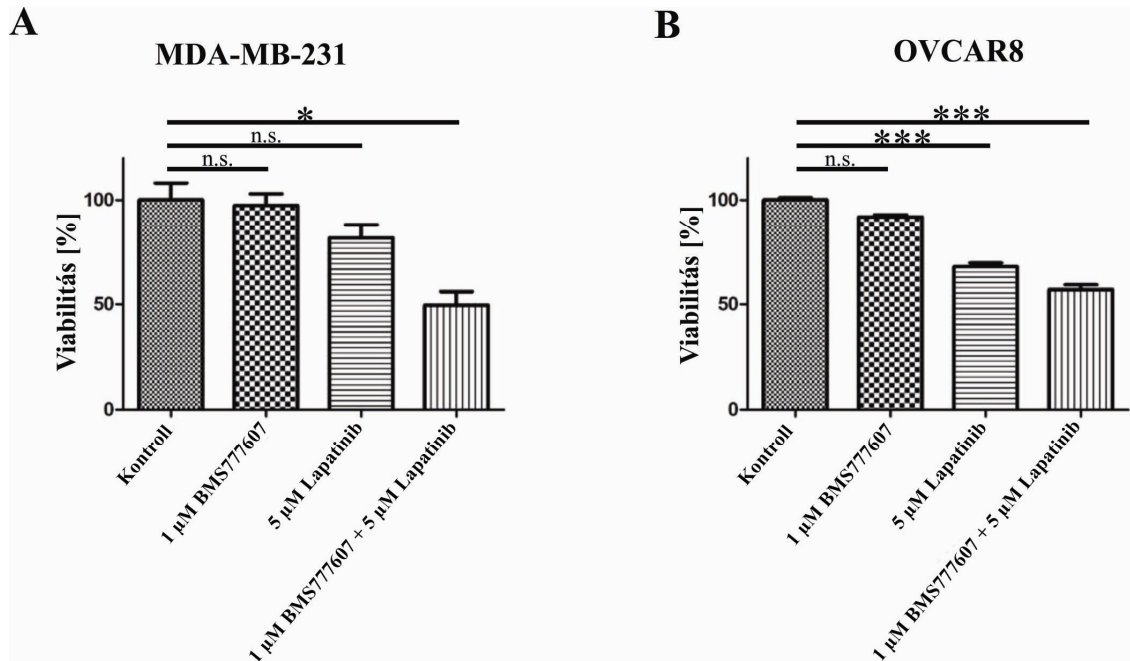
Az MDA-MB-231 (A) és az OVCAR8 (B) sejteket 24 óráig $1 \mu\text{M}$ BMS777607 vagy $1 \mu\text{M}$ BMS777607 és $5 \mu\text{M}$ Lapatinib kombinációjával kezeltük, majd 15 percig 50 ng/ml NRG1-el stimuláltuk. A fehérjék foszforilációját specifikus antitestekkel, míg a fehérjesávok erősségét denzitometriás analízissel ellenőriztük (C).

Az OVCAR8 sejtekben az 1 μM BMS777607-el való kezelés hasonló módon indukálta a HER3 fehérje expresszióját és foszforilációját mint az MDA-MB-231 sejtvonalonban (22 B, C ábra). Viszont ebben a sejtvonalonban a kontroll sejtekhez képest a BMS777607 által indukált HER3 foszforiláció 1,4-szeresen restaurálta a foszfo-AKT szignált (22 B, C ábra). Az 50 ng/ml NRG1-el való stimuláció 10-szeres illetve 17,8-szoros HER3 foszfo-Y1289 jelerősödést okozott a DMSO kontroll illetve az 1 μM BMS777607-el kezelt OVCAR8 sejtekben (22 B, C ábra). A BMS777607 és a Lapatinib kombinációs kezelések megakadályozták a HER3 és az AKT foszforilációját, és ezt a gátlást a NRG1-el való stimulációs kezelések sem oldották fel (22 B, C ábra). A HER2 foszforilációja azonos volt a HER3 foszforilációs mintázatával, megerősítve a HER2 fontosságát a HER3 aktivációjában (22 B, C ábra).

A fentiekben tárgyalt eredmények azt mutatják, hogy az OVCAR8 illetve az MDA-MB-231 sejtvonalakban a BMS777607 által indukált foszfo-HER3 restaurálja, illetve stabilizálja az AKT foszforiláltságát, míg a kombinációs kezelések hatékonyan gátolják a foszfo-HER3-at és az foszfo-AKT-ot mindkét sejtvonalonban

5.2.8. Az AXL receptor tirozin kináz foszforilációjának a gátlása érzékennyé teszi a sejteket a Lapatinib kezelésre

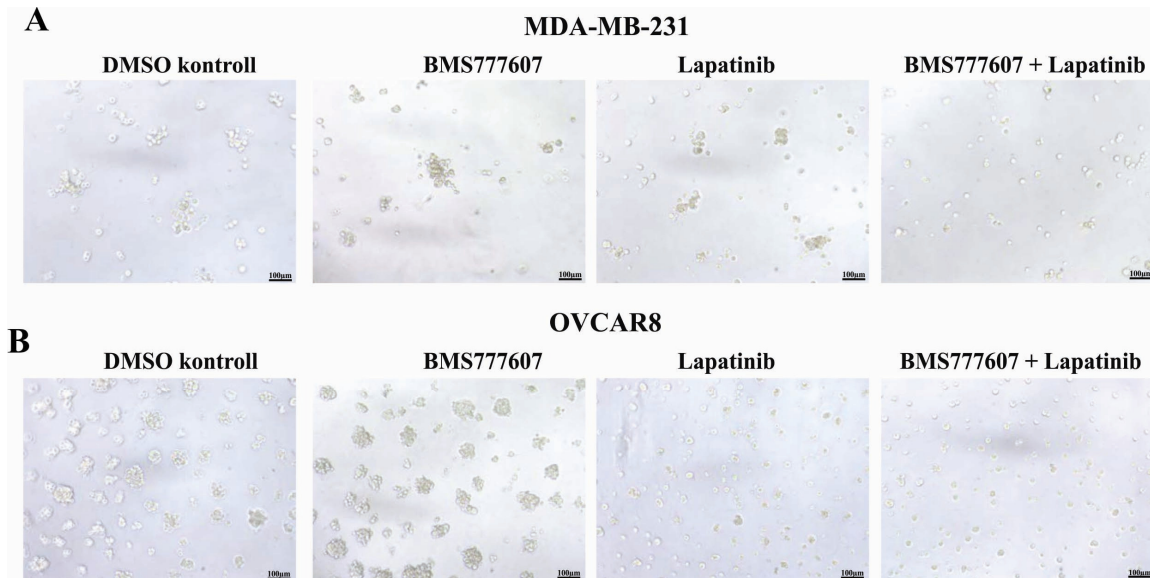
A következő lépésben további kombinációs kísérleteket végeztünk az MDA-MB-231 és az OVCAR8 sejt-szferoidokon. Ezekhez a vizsgálatokhoz az MDA-MB-231 szferoidokat szérumentes körülmények között 1 μM BMS777607-el és 5 μM Lapatinibbel kezeltük. Az inhibitor kombinációkkal kezelt sejtek viabilitása a kontrollhoz és csak az egyik inhibitorral kezelt sejtekhez képest, 50%-al csökkent (23 A ábra). Az OVCAR8 szferoidok viabilitását a kombinációs és az 5 μM Lapatinib-es kezelések szignifikánsan csökkentették (23 A ábra).



23. ábra. BMS777607 és Lapatinib az MDA-MB-231 sejtszferoidok viabilitását egymást erősítve míg az OVCAR8 sejtszferoidok viabilitását additíven gátolják

Az MDA-MB-231 (A) és OVCAR8 (B) 3D sejtszferoidokat 1 μM BMS777607-el, 5 μM Lapatinibbel vagy 1 μM BMS777607 és 5 μM Lapatinib kombinációjával kezeltük. A sejtek viabilitását 72 órás inkubációt követően CellTiter Glo assay-vel mértük le. Szignifikánsnak a $*=p<0,005$, $**=p<0,01$ és $***=p<0,001$ különbségeket tekintettük (Kruskal-Wallis teszt, n.s. = nem szignifikáns).

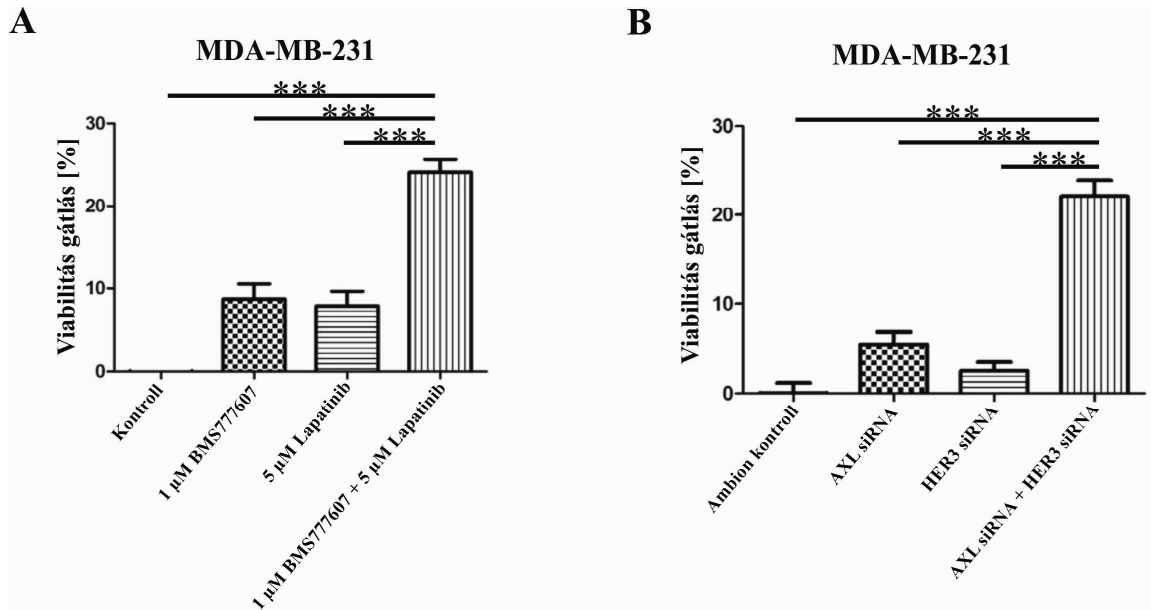
Mivel az OVCAR8 sejtekben a HER2 expressziója sokkal magasabb, mint az MDA-MB-231 sejtekben, ezért az OVCAR8 szferoidok sokkal érzékenyebben reagálnak a Lapatinib kezelésre, mint az MDA-MB-231 szferoidok (23 B és 24 B ábra). Szérumos körülmények között a kombinációs kezelések hatása hasonló, de kevésbé befolyásolja az MDA-MB-231 szferoidok viabilitát (25 A ábra).



24. ábra. Az MDA-MB-231 szferoidok

Az MDA-MB-231 sejtszferoidok 72 óráig 1 µM BMS777607-el vagy 5 µM Lapatinib-el vagy a két inhibitor kombinációjával voltak kezelve. A skála oszlop 100 µm nagyságot jelez.

Ezt az eredményt megerősítendő, HER3 és AXL siRNS-ekkel kombinációban illetve külön-külön géncsendésítést végeztünk. Ahogy a 25 B ábra mutatja, a kombinációs inhibitor kezelésekhez hasonlóan az AXL és a HER3 egyidejű géncsendesítése szignifikánsan (22%-al) csökkentette az MDA-MB-231 sejtek viabilitását.



25. ábra. A BMS777607 és Lapatinib kezelés egymást erősítve gátolja az MDA-MB-231-es szferoidok viabilitását.

Az MDA-MB-231-es sejtszferoidokat 1 μ M BMS777607-el, 5 μ M Lapatinibbel, vagy a két inhibitor kombinációjával kezeltük (A). Az MDA-MB-231 sejteket 48 óráig AXL és HER3 specifikus siRNS-ekkel kezeltük, majd további 72 óráig sejtszferoidokat növesztettünk belőlük (B). A sejtek viabilitását 72 órás inkubációt követően CellTiter Glo assay-vel mértük meg. Szignifikánsnak a $*=p<0,005$, $**=p<0,01$ és $***=p<0,001$ különbségeket tekintettük (Kruskal-Wallis teszt, n.s. = nem szignifikáns). Az átlag és a szórás ábrázolva van.

Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy a 3D Matrigel assay-ben az MDA-MB-231 és az OVCAR8 szferoidok viabilitását szignifikánsan befolyásolja a BMS777607 és Lapatinib kombinációs kezelés. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az AXL overexpresszióval rendelkező daganatsejtek viabilitását hatékonyan csak akkor tudjuk csökkenteni, ha egyidejűleg gátoljuk az AXL és a HER2/HER3 heterodimer komplexet is.

6. Megbeszélés

A daganatokban előforduló génhibák vagy epigenetikai zavarok révén keletkezett mutáns és/vagy overexpresszált fehérjék célzott daganatterápiája a daganatgyógyítás egyik nagy mérföldkövének számít. Sikerességét jól érzékelteti az évről évre törzkönyvezett gyógyszermolekulák és az egyre növekvő vizsgált hatóanyagok száma. Az utóbbi évek kutatási eredményei alapján számos új, lehetséges célpontot azonosítottak, ezek egyike az AXL receptor tirozin kináz, mivel fontos szerepet tölt be a daganatsejtek túlélésében, migrációjában, de a daganatterápiás szerekkel szembeni másodlagos rezisztenciában is [123].

Doktori munkám során elsősorban a tripla negatív emlődaganat viselkedése mögött megbúvó, jeltovábbítást szerettük volna jobban megérteni és feltérképezni. Éppen ezért a célkitűzésben megfogalmazott célokat főképpen a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakon vizsgáltuk meg. Habár már számos tanulmány kimutatta, hogy az AXL fehérje expressziójának gátlása csökkenti a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációját [98, 123, 139], az AXL foszforilációjának, azaz aktivitásának a szerepét a tripla negatív sejtvonalak migrációjában egyik tanulmány sem tisztázta.

Éppen ezért a doktori munkám első fázisában elsősorban az AXL foszforilációjának a funkcióját vizsgáltuk meg a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációjában. A kísérleteinkhez egy c-Met és AXL szelektív (BMS777607) és két több célponton ható (SKI606 és MPCD84111) inhibitor használtunk. Emellett megvizsgáltuk a Lyn és a p130Cas fehérjék hatását is a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációjára és viabilitására. A kapott eredmények rámutattak arra, hogy a célzott AXL tirozinkináz gátlás nem elegendő ahhoz, hogy szignifikánsan csökkentsük a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációját. Hasonló következtetésre jutottak Tan és munkatársai (2014) is, miután nem-kissejtes tüdődaganatos sejtvonalakon megvizsgálták az SKI606 migráció gátló hatását [140]. Az SKI606 migráció gátló hatása ugyanis független volt az AXL tirozinkinázról [140]. Ezzel szemben Zhang és munkatársai 2008-as publikációjában az SKI606 migráció gátló potenciálját az inhibitor AXL foszforilációjára gyakorolt hatásával

hozták összefüggésbe, ami ellenmondásos, mivel az inhibitor migráció gátló IC_{50} értékei sokkal magasabbak voltak az inhibitor AXL foszforiláció gátló IC_{50} értékeinél [123]. Hasonló ellentmondás figyelhető meg Holland és munkatársai 2010-es tanulmányában is [97], ahol az R428 AXL inhibitor invázió gátló IC_{50} értéke (3000 nM) mintegy 200-szor volt magasabb az inhibitor AXL foszforiláció gátló IC_{50} értékénél (14 nM).

Vouriluoto és munkatársai 2009-es publikációjukban kimutatták, hogy az inaktív kinázdoménnel rendelkező AXL tirozinkináz fehérje nem befolyásolja az MDA-MB-231 sejtvonal migrációját [139]. E tanulmány és saját eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az AXL tirozinkináz receptornak lehet egy foszforiláció független funkciója is. Éppen ezért nem zárható ki annak a valószínűsége, hogy az AXL fehérje adhéziós vagy állványfehérjeként fontos szerepet tölt be a daganatsejtek migrációjában, ahogyan arra az AXL siRNS kezelések migráció gátló hatásaiból következtetni lehet [98, 123].

Az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorok célmolekula profilja arra utalt, hogy a két vegyület által közösen gátolt SRC kináz család tagjainak a gátlása az oka annak, hogy a fent említett két inhibitor sokkal jobban gátolja a sejtmigrációt, mint a leghatékonyabb AXL tirozin kináz gátló, a BMS777607.

Mivel az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorok által közösen legátolt SRC család tagjai közül a Lyn mind három sejtvonalban overexpresszált, ezért egy másik migrációs fehérjével (p130Cas) együtt megvizsgáltuk, hogy milyen szerepe van a tripla negatív sejtvonalak migrációjában és viabilitásában [128]. A Lyn kináz főképpen a daganatsejtek migrációját és proliferációját irányítja, éppen ezért azokban a szolid és hemopoetikus tumorokban, amelyekben overexpresszált, az egyik legfontosabb célpontnak számít [128, 141-146]. A p130Cas is fontos szerepet tölt be a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak inváziójában és migrációjában [147]. A p130Cas állványfehérjeként a FAK, Lyn, Pyk2 és más jeltovábbításban szerepet játszó kinázokhoz kötődik, ezáltal indukálva a sejtek migrációját [148].

Kísérleteinkkel bebizonyítottuk a Lyn és a p130Cas szignifikáns hatását a tripla negatív sejtvonalak migrációjára. Továbbá sikerült kimutatni, hogy az SKI606 és az MPCD84111 hasonlóképpen gátolja mind a három tanulmányozott tripla negatív sejtvonal főbb

migrációs fehérjéinek az aktivitását(Pyk2 (Y580), FAK (Y576/577), p130Cas (Y410) és Lyn (Y507)), míg a BMS777607 nem befolyásolja ezen fehérjék foszforilációját. Ismert, hogy a c-Src fontos szerepet játszik a daganatos sejt vonalak migrációjában [149, 150]. Abból a megfigyelésből, hogy az MPCD84111 a c-Src gátlása nélkül gátolta az általunk tanulmányozott sejt vonalak migrációját, arra következtetünk, hogy a c-Src nem esszenciális e sejt vonalak migrációjában. Mivel az inhibitorok sejtéletképeség gátló IC_{50} értékei sokkal magasabbak voltak a migráció gátló IC_{50} értékeknél, kizárhatjuk, hogy a vizsgált sejt vonalakban az inhibitorok migráció gátlása összefüggésben lenne viabilitásgátló képességükkel. A fentiekben tárgyaltak alapján elmondhatjuk, hogy az SKI606 és MPCD84111 migráció gátlása független AXL aktivitásától, amielsősorban annak köszönhető, hogy gátolják a Lyn és a p130Cas aktivitását. Érdeemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a Lyn és a p130Cas gátlása révén a sejt migráció teljesen nem gátolható le. A fentiekben tárgyaltak alapján arra következtetünk, hogy a tripla negatív emlődaganatos sejt vonalak terápiája két módon válhat sikeresebbé: vagy több célpontú inhibitorok alkalmazásával, amelyek egyéb kinázok mellett a Lyn és a p130Cas foszforilációját is blokkolják (például MPCD84111), vagy ha az AXL inhibitor migrációs kináz inhibitorokkal kombinációban alkalmazzuk.

A célzott daganatterápia sikerességének legfőbb árnyoldala a célzott gyógyszer-molekulákkal szemben fellépő rezisztencia. Éppen ezért kiemelten fontos a rezisztencia okainak felderítése. Doktori munkám második felében az AXL tirozinkináz gátlással szembeni kompenzációs mechanizmusok kialakulását tanulmányoztam, különös tekintettel a többi tirozinkináz aktivitásának a változásaira.

Kísérleteink alapját egy olyan tripla negatív emlődaganatos sejt vonal, az MDA-MB-231-es képezte, amely kiválóan modellezte ennek a daganattípusnak a heterogenitását és agresszivitását. Az eredményeink váratlan mechanizmusra világítottak rá, hiszen az találtuk, hogy még a tripla negatív emlődaganatos sejt vonalban is, az AXL gátlás a HER3 receptor aktiválódása révén kompenzálódik. Ez az eredmény alátámasztja az eddig ismerteket, hogy a tripla negatív emlődaganat jeltovábbítása rendkívül komplex, nemcsak egy, hanem több jelút is meghatározza ennek a daganattípusnak az agresszivitását. Továbbá

ennek az eredmények az alapján nem zárható ki, hogy a HER3 meghatározó szerepet fog játszani a szelektíven AXL-t célzó tripla negatív daganatok terápiás választásában.

Ezt a következtetést támasztja alá három AXL receptor tirozin kináz inhibitorral végzett kísérletünk, ugyanis azt vettük észre, hogy a BMS777607 és az R428 előidézi, míg az MPCD84111 nem indukálja a HER3 foszforilációját, viszont mindhárom inhibitor gátolja az AKT aktivitását. Ismert, hogy az AKT foszforilációjának gátlása következtében a FoxO család tagjai transzlokálódnak a sejtmagba, ahol többek között elindítják a HER3, InsR, IGFR fehérjéket kódoló gének transzkripcióját [132, 133]. Éppen ezért úgy gondoljuk, hogy az AXL inhibitorok az AKT gátlása révén felszabaduló FoxO fehérjék által indítják el a HER3 transzkripcióját, ami végül a HER3 fehérje mennyiségi növekedéséhez vezet. A BMS777607 és MPCD84111 AXL inhibitorokkal végzett kísérletekkel kimutattuk, hogy csak az MPCD84111 képes megakadályozni a HER3 foszforilációját, viszont hasonlóan a BMS777607 inhibitorhoz, az MPCD84111 kezelés is előidézi a HER3 expresszióját.

Hogy megértsük, hogy az MPCD84111-es miért gátolja a HER3 indukcióját kináz szelektivitás „profiling assay”-vel és a magas HER2 expresszióval rendelkező MCF7 sejtvonalon demonstráltuk, hogy az MPCD84111 inhibitor gátolja a HER3 elsődleges dimerizációs partnerét, a HER2 aktivitását.

Ismert, hogy a HER3 receptornak nincsen tirozin kináz aktivitása és csak heterodimer formában tud aktiválódni, elsődlegesen a HER2 receptorhoz kapcsolódva [151, 152]. Ennek az információnak és annak az eredménynek a tudatában, hogy az MPCD84111 célozza a HER2-t, elsősorban a HER2-re összpontosítottunk, hogy megvizsgáljuk, milyen szerepet tölt be a HER3 aktivációjában. Habár az MDA-MB-231 tripla negatív emlődaganatos sejtvonalban az ösztrogén, progeszteron és HER2 receptorok expressziós szintje nagyon alacsony [153], az eredményeink azt mutatják, hogy a HER3 ebben a tripla negatív sejtvonalban is elsődlegesen a HER2-vel dimerizálódik.

Az MPCD84111 inhibitor tehát ígéretes kiindulási pontja lehet egy AXL/HER2 kettős gátló kifejlesztésének, ami a kialakuló rezisztencia mechanizmusát is már eleve blokkolja. Ugyanakkor az MPCD84111 HER2 gátló hatása még nem elég erős. Ezért második lépésben a kombinációs terápia szempontjából közelítettük meg a kérdést. Hogy a

HER2/HER3 komplex fontosságát bizonyítsuk, az AXL inhibitorokat olyan gátlószerekkel adtuk szimultán, amelyek elsődlegesen a HER2-öt célozzák.

Számos kísérlettel szemléltettük, hogy a két FDA által jóváhagyott terápiás szer, a Herceptin és a Lapatinib képes gátolni a HER3 foszforilációját. Fontos megjegyezni, hogy teljes HER3 foszforiláció gátlást csak egyidejű EGFR és HER2 siRNS-el történő géncsendesítés, illetve az EGFR/HER2 kettős kinázgátló Lapatinibbel végzett kezelések után tapasztaltunk. Habár monoterápiában sem az EGFR specifikus siRNS, sem az Erbitux antitest nem okozott változást a HER3 foszforilációjában, nem tudjuk kizárni annak a lehetőségét, hogy az EGFR is szerepet játszik a HER3 aktivációjában. Ezért ahhoz, hogy hatékonyan megakadályozzuk a HER3 foszforilációját, mindenképpen olyan inhibitorok alkalmazása szükséges, amelyek a HER2 mellett az EGFR-t is legátolják. Igen érdekes, hogy az általunk talált összefüggés fordítottja már ismert: az AXL működése az EGFR inhibitorokkal szembeni rezisztenciához vezet [108]. Ez a jelenség is mutatja a jelátviteli útvonalak nagyfokú komplexitását, ami a tumorsejtek roppant alkalmazkodó-képességének alapja.

További sejtvitalitás kísérletekben demonstráltuk a NRG1/HER2/HER3 kompenzációs mechanizmus fontosságát. A HER3 ligand NRG1 teljesen kivédte a BMS777607 sejtvitalitás gátló hatását, míg a kontroll sejtek vitalitását nem befolyásolta. Az eredményeink azt mutatják, hogy az AXL/PI3K/AKT jeltovábbítási útvonal gátlása és a HER3 megnövekedett expressziója is előfeltétele a NRG1 ligand függő HER3 aktivációnak. Valószínű, hogy a HER3 aktivációja fontos a daganatok mikro környezetében és a tirozinkináz inhibitorokkal szembeni parakrin rezisztenciában. A parakrin rezisztenciát BCR-ABL inhibitorokkal kezelt CML-es betegekben és EGFR inhibitorokkal kezelt nem-kissejtes tüdő daganatos betegekben írták le [154, 155]. Ezekben a páciensekben a strómafibroblasztok által termelt HGF a c-MET aktivációja révén indukálta az EGFR inhibitorokkal szembeni rezisztenciát. Ezért kulcsfontosságú olyan többszörös támadáspontú hatóanyagok használata (mint például az MPCD84111 vagy a Szokol et al. publikációjában leírt 10-es inhibitor), melyek az EGFR mellett a c-Met kinázt is gátolják [127]. Továbbá nemrég írták le, hogy daganattal kapcsolatban levő makrofágok EGFR liggaddal látják el a daganatokat [156]. Ismert, hogy a daganat környezetében elhelyezkedő

fibroblasztok, endothél sejtek és periférikus monociták NRG1-et termelnek, ezáltal hozzájárulva a daganat környezete által indukált in vivo rezisztencia mechanizmusokhoz [157-159]. A csontvelőből származó mezenchimális őssejtek és a daganattal kapcsolatban levő mezenchimális sejtek által termelt NRG1 a daganat HER3 receptorain keresztül képes serkenteni a vastagbél daganatok progresszióját [160]. Továbbá bizonyított, hogy a humán vérszérum is jelentős koncentrációban tartalmaz NRG1-et [161]. Nemrég kimutatták, hogy a tripla negatív emlődaganatos őssejtek által termelt NRG1 elősegíti a HER2 receptort alacsonyán expresszáló tripla negatív sejtvonalak proliferációját és megújulását [162]. Eredményeink azt jelzik, hogy az MDA-MB-231 sejtek autokrin módon választják ki a NRG1-et és hogy a NRG1 csökkenése szorosan összefügg a BMS777607 által indukált HER3 foszforiláció erősödésével. Ez a mechanizmus hozzájárulhat a daganat környezet által indukált parakrin rezisztenciához.

Kísérleteinkkel tehát bizonyítottuk, hogy azokban a daganatsejtekben, amelyben a HER2 és a HER3 fehérjék expressziója alacsony, az AXL/PI3K/AKT tengely gátlása a HER3 kináz megnövekedett expressziójához vezet. A HER3 és dimerizációs partnerei pedig a tumor és környezete által termelt ligandok (például az NRG1) hatására foszforilálódnak/aktiválódnak, ami viszont a stimulálja a sejtproliferációt. Ez a rezisztencia mechanizmus a HER3 dimerizációs partnereinek (EGFR és HER2) Lapatinibbel történő kombinációs gátlásával kivédhető volt. Ezt az eredményt kombinációs siRNS kezelésekkel is alátámasztottuk.

A 20 különböző eredetű, AXL overexpresszióval rendelkező daganatos sejtvonalon végzett AXL siRNS géncsendesítés és BMS777607 inhibitorral végzett AXL kinázgátlás rámutattak, hogy ez a kompenzációs mechanizmus nemcsak az AXL overexpressziótól hanem a sejtvonalak AKT S473 foszforilációs szintjétől is függ. Ugyanis alacsony AKT foszfo-S473 szinttel rendelkező 10 sejtvonalból 7-ben BMS777607 vagy AXL siRNS kezelés hatására a HER3 foszfo-Y1289 szintje megemelkedett. A magas AKT foszfo-S473 szinttel rendelkező 10 sejtvonala közül csupán két sejtvonalba volt megfigyelhető hasonló HER3 foszforiláció. Ez a magas AKT foszfo-S473 szint főképpen azokra a sejtvonalakra jellemző amelyekből hiányzik a PI3K-t gátló PTEN fehérje, vagy eleve PI3K aktivációs mutációval rendelkeznek mint például az U373, az SF126 és az

U118 glioma sejtvonalak[163, 164]. Ezek a sejtek kevésbé érzékenyek az AXL/PI3K/AKT jeltovábbítási útvonal kiesésére, éppen ezért ezekben a sejtvonalakban az AXL gátlás következtében a HER3 foszforiláció nem változott. Ezek alapján arra következtetünk, hogy az AXL gátlás miatt indukálódott HER3 foszforilációt nem a daganat mutációs háttere, hanem sokkal inkább az AXL expressziója és az AKT foszfo-S473 szintje határozza meg. Feltételezzük, hogy az AKT kináz fontos szerepet tölt be a receptoroktól érkező jelek továbbításában, éppen ezért a PTEN hiánya és a PI3K aktivációs mutációk csökkentik az AKT gátlószerekkel szembeni érzékenységét, míg az alacsony AKT foszfo-S473 szinttel rendelkező daganatok a membrán receptoroktól érkező jelektől függenek jobban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AXL elleni célzott daganatellenes terápiában az AKT és a HER3 foszforilációjának a szintje alkalmas biomarkerek lennének ahhoz, hogy előre jelezzük a daganatellenes terápiának az eredményességét.

Eredményeinkből arra következtetünk, hogy az AXL overexpresszióval és alacsony AKT foszfo-S473 szinttel rendelkező daganatokban a szelektív AXL-t célzó daganatterápia hatékonyságát csökkenteni fogja a HER3 indukciója. Éppen ezért úgy gondoljuk, hogy a sikeres daganatterápia előfeltétele lesz, hogy az az AXL mellett a HER receptorokat is gátoljuk. E célt elérhetjük többszörös támadáspontú inhibitorokkal, mint például az MPCD84111, vagy az AXL gátlók HER2/HER3, illetve EGFR/HER3 antagonistákkal való kombinálásával.

Az általunk feltárt mechanizmus egy újabb kitűnő példa arra, hogy a tumorsejtek abnormális osztódását és migrációját hogyan hajtja egy túlműködő onkogén, illetve a belőle kiinduló jelpálya, és hogy az onkogén kiesése (legátlása) hogyan kompenzálódik, ugyanazon jelpályában szereplő másik onkogén túlműködtetésével.

7. Következtetések

- Kimutattuk, hogy a legagresszívebb típusú emlődaganat, a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációját hatékonyan csak azok az AXL tirozin kináz inhibitorok gátolták, amelyek a Lyn kinázt és a p130Cas állványfehérjét is gátolták.
- Az eredményeink azt mutatják, hogy az AXL fehérje overexpressziójából nem következik, hogy a sejtmigráció egyedül az AXL tirozin kináz aktivitásától függ.
- Az elsők között bizonyítottuk be, hogy az AXL gátlása indukálja a HER3 receptor tirozin kináz foszforilációját és ez az indukció nemcsak az AXL overexpressziójától hanem a sejtvonalak AKT S473 foszforilációs szintjétől is függ.
- Igazoltuk, hogy a HER3 aktivációja független a HER3 és NRG1 transzkripciójától, viszont ez az aktiváció NRG1 ligand függő.
- Bebizonyítottuk, hogy a HER3 még a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakban is a HER2-vel dimerizálódik.
- Kimutattuk, hogy az a HER3 teljes inaktivációjához, a HER2 és az EGFR együttes gátlása szükséges.
- Megfigyeltük, hogy az alacsony AKT S473 szinttel és AXL overexpresszióval rendelkező sejtvonalak viabilitás gátlásához az AXL mellett a HER2 és az EGFRkinázokategyüttesen célzó terápia szükséges.

7.1 Az eredmények jelentősége a daganatkutatás és terápia szempontjából

Ebben a doktori disszertációban bemutatott eredmények alap kutatási jelentőségük mellett a daganatterápia szempontjából is szignifikánsak. Ahhoz, hogy megakadályozzuk a betegség súlyosbodását, azaz a daganatsejtek migrációját/metasztázisát és a célzott terápiával szembeni rezisztenciát, meg kell ismernünk a daganatsejtek viselkedését és terápiás válaszát a használt célzott daganatterápiás szerekkel szemben. Ebben a dolgozatban tárgyalt

eredmények mindkét jelenségről szerzett tudásunkat gyarapítják. Az AXL receptor tirozin kinázról irodalmi adatok alapján sejteni lehetett, hogy fontos szerepet tölt be a daganatsejtek migrációjában, de az eredményeink megerősítették azt a tényt, hogy kizárólag az AXL gátlása nem elégséges a daganatsejtek metasztázisának megakadályozásához. A sejt migráció egy bonyolult folyamat, amely nem egy, hanem számos fehérje működésétől függ, így egy jövőbeni antimetasztatikus kezelésnek is több célpontra kell hatnia.

Eredményeink a tripla negatív emlődaganat példáján keresztül előrevetítik, hogy egy célzott AXL gátló kezelés csak bizonyos fehérje expressziós környezetben lehet sikeres, és hogy ellene milyen kompenzációs mechanizmusok lépnek fel. Újabb példát találtunk tehát arra, hogy a célzott daganatterápia határain csak kombinációs stratégiákkal lehet túllépni.

8. Összefoglalás

Növekvő számú irodalmi adat igazolja az AXL receptor tirozin kináz szerepét a daganatos sejtek migrációjában és a célzott daganatterápiás kináz inhibitorokkal szembeni szerzett rezisztencia kialakulásában. Mivel az AXL tirozin kináz inhibitorok migrációt gátló hatékonysága és az AXL gátlás más RTK-ok aktivációjára gyakorolt hatásai nem ismertek, ezért ennek a doktori munkának fő célkitűzései közé tartozott ennek e két területnek az alaposabb feltérképezése. Demonstráltuk, hogy az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorokkal ellentétben a BMS777607 által szelektíven legátolt AXL foszforiláció nem elegendő ahhoz, hogy a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációját legátoljuk. Az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorok célpont profiljának a vizsgálata során azt találtuk, hogy gátolják a SRC család bizonyos tagjait. A Lyn és egy másik migrációs fehérje, a p130Cas elemzése igazolta hatásukat a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációjában. Továbbá a vizsgált sejtvonalakban a Western blot-os kísérletek is alátámasztották az SKI606 és az MPCD84111 Lyn fehérjék foszforiláció gátló képességét. Következtetesképpen elmondhatjuk, hogy azok az inhibitorok, amelyek az AXL mellett a Lyn és a p130Cas fehérjéket is célozzák, sokkal eredményesebbek lehetnek AXL overexpresszióval rendelkező daganatok daganatellenes terápiájában. Bizonyítottuk, hogy AXL gátlás indukálja a HER3 foszforilációját. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy a HER3 aktivációjának az egyik előfeltétele az alacsony AKT S473 foszforilációs szint. Sikerült bizonyítani továbbá, hogy a HER3 aktivációja NRG1 ligand függő. Ugyanakkor igazoltuk, hogy alacsony, vagy alig detektálható HER2 expresszióval rendelkező tripla negatív emlődaganatos sejtekben is elsősorban a HER2-vel való dimerizációja révén foszforilálódik a HER3. Kimutattuk, hogy az MPCD84111 AXL inhibitor a HER3/2 komplex gátlása révén megakadályozza a HER3 aktivációját. Továbbá az siRNS géncsendesítés, vagy a BMS777607 és Lapatinib kezelések kombinációja az MDA-MB-231 és az OVCAR8 sejtek proliferációjának a csökkenéséhez vezetett. Ezen eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az AXL overexpresszióval és alacsony AKT aktivitással

rendelkező daganatok terápiájában az AXL mellett a HER3/2 komplexet is célzó kináz inhibitorok használata megelőzné az AXL inhibitorokkal szembeni szerzett rezisztenciát.

9. Summary

Increasing number of publication confirmed the important role of the AXL receptor tyrosine kinase in cancer cell migration and acquired resistance to single targeted kinase inhibitors. Since the efficiency of AXL tyrosine kinase inhibitors on migration and the effect of AXL inhibition on other RTKs activation had not been studied, the main aims of this PhD work was to explore these areas in detail. We show that in contrast with SKI606 and MPCD84111 the selective inhibition of AXL phosphorylation by BMS777607 is not sufficient to block migration of triple negative breast cancer cell lines significantly. Examining the target profile of SKI606 and MPCD84111 we indentified SRC family kinases as common targets of both inhibitors. The analysis of Lyn and another migration related protein p130Cas confirmed their impact on the migration of studied triple negative breast cancer cell lines. Western blot experiments underlined that SKI606 and MPCD84111 inhibits phosphorylation of Lyn and p130Cas in all studied triple negative breast cancer cell lines. Therefore we conclude that using kinase inhibitors which target Lyn and p130Cas would be more efficient in the therapy of cancers with AXL overexpression.

We proved that inhibition of AXL kinase induces the phosphorylation of HER3. In parallel we showed that the low level of AKT S473 is required for HER3 activation. We could also demonstrate that the early activation of HER3 depends on the NRG1 ligand. Checking the dimerization partner for HER3 we found that even in triple negative cell lines, with almost undetectable HER2 levels, mainly HER2 is responsible for HER3 activation. Using MPCD84111 AXL tyrosine kinase inhibitor which targets also the HER3/2 complex, complete blockade of HER3 could be achieved. Moreover, dual inhibition of AXL and HER3/2 complex by siRNA or BMS777607 and Lapatinib treatments led to the inhibition of MDA-MB-231 and OVCAR8 cell proliferation. Based on these results we conclude that in the therapy of cancers with AXL overexpression and low AKT activity the use of inhibitors which target AXL and HER3/2 complex would overcome the aquiered resistance against AXL kinase inhibition.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA. (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 355: 2408-2417.
- [2] Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, Rigas J, Clark GM, Santabarbara P, Bonomi P. (2004) Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 22: 3238-3247.
- [3] Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L. (2008) Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26: 1275-1281.
- [4] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*, 339: 1546-1558.
- [5] Blume-Jensen P, Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411:355-365.
- [6] Thomas SM, Brugge JS. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 513-609.
- [7] Sen B, Johnson FM. (2011) Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct*, 2011: 865819.
- [8] Harburger DS, Calderwood DA. (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, 122: 159-163.

- [9] Zachary I, Rozengurt E. (1992) Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. *Cell*, 71:891-894.
- [10] Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Bio*, 15: 954-963.
- [11] Ingley E. (2012) Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease. *Cell Commun Signal CCS*, 10:21.
- [12] Polte TR, Hanks SK. (1995) Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10678-10682.
- [13] Schaller MD, Sasaki T. (1997) Differential signaling by the focal adhesion kinase and cell adhesion kinase beta. *J Biol Chem*, 272: 25319-25325.
- [14] Bruzzaniti A, Neff L, Sandoval A, Du L, Horne WC, Baron R. (2009) Dynamin reduces Pyk2 Y402 phosphorylation and SRC binding in osteoclasts. *Mol Cell Biol*, 29: 3644-3656.
- [15] Astier A, Manié SN, Avraham H, Hirai H, Law SF, Zhang Y, Golemis EA, Fu Y, Druker BJ, Haghayeghi N, Freedman AS, Avraham S. (1997) The related adhesion focal tyrosine kinase differentially phosphorylates p130Cas and the Cas-like protein, p105HEF1. *J Biol Chem*, 272: 19719-19724.
- [16] Ullrich A, Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203-212.
- [17] Lemmon MA, Schlessinger J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141: 1117-1134.
- [18] Lai C, Lemke G. (1991) An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*, 6: 691-704.
- [19] Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Vesin C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P. (2005) Role of

- Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest*, 115: 237-246.
- [20] Behrens EM, Gadue P, Gong SY, Garrett S, Stein PL, Cohen PL. (2003) The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur J Immunol*, 33: 2160-2167.
- [21] Graham DK, Bowman GW, Dawson TL, Stanford WL, Earp HS, Snodgrass HR. (1995) Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*, 10: 2349-2359.
- [22] Lu Q, Lemke G. (2001) Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*, 293: 306-311.
- [23] Mark MR, Scadden DT, Wang Z, Gu Q, Goddard A, Godowski PJ. (1994) rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem*, 269: 10720-10728.
- [24] Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G. (1999) Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*, 398: 723-728.
- [25] Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. (2008) TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*, 100:35-83.
- [26] Lemke G, Rothlin CV. (2008) Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*, 8: 327-336.
- [27] Lemke G, Burstyn-Cohen T. (2010) TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1209:23-29
- [28] Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. (2003) Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*, 4: 87-91.
- [29] Lemke G, Lu Q. (2003) Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol*, 15: 31-36.

- [30] Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. (2007) TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 131: 1124-1136.
- [31] Gaipf US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, Voll RE, Winkler T, Kuhn A, Kalden J, Kern P, Herrmann M. (2007) Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun*, 28: 114-121.
- [32] Nagata S, Hanayama R, Kawane K. (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 140: 619-630.
- [33] Caraux A, Lu Q, Fernandez N, Riou S, Di Santo JP, Raulet DH, Lemke G, Roth C. (2006) Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nat Immunol*, 7: 747-754.
- [34] Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM, Graham DK. (2007) A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*, 109: 1026-1033.
- [35] Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai LK, Jin ZG, Haendeler J, Berk BC. (2004) Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*, 37: 881-887.
- [36] Fridell YW, Villa J, Jr., Attar EC, Liu ET. (1998) GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 273: 7123-7126.
- [37] Collett GD, Sage AP, Kirton JP, Alexander MY, Gilmore AP, Canfield AE. (2007) Axl/phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits mineral deposition by vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 100: 502-509.
- [38] Healy AM, Schwartz JJ, Zhu X, Herrick BE, Varnum B, Farber HW. (2001) Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280:L1273-1281.
- [39] Yamagata M, Sanes JR, Weiner JA. (2003) Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 621-632.
- [40] Robinson DR, Wu YM, Lin SF. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19: 5548-5557.
- [41] Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 915-925.

- [42] Hafizi S, Dahlback B. (2006) Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17: 295-304.
- [43] Schulz AS, Schleithoff L, Faust M, Bartram CR, Janssen JW. (1993) The genomic structure of the human UFO receptor. *Oncogene*, 8: 509-513.
- [44] Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, Yanagihara D, Bennett L, Sylber M, Merewether LA, Tseng A, Escobar E, Liu ET, Yamane HK. (1995) Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature*, 373: 623-626.
- [45] Crosier PS, Freeman SA, Orlic D, Bodine DM, Crosier KE. (1996) The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. *Exp Hematol*, 24: 318-323.
- [46] Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen DH, DiStefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ, Yancopoulos GD. (1995) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 80: 661-670.
- [47] Chen J, Carey K, Godowski PJ. (1997) Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene*, 14: 2033-2039.
- [48] Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowsk PJ. (1996) Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem*, 271: 9785-9789.
- [49] Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K. (1995) Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem*, 270: 22681-22684.
- [50] Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G. (2006) TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*, 33: 96-108.

- [51] Dahlback B, Villoutreix BO. (2005) Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 1311-1320.
- [52] Huang M, Rigby AC, Morelli X, Grant MA, Huang G, Furie B, Seaton B, Furie BC. (2003) Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat Struct Biol*, 10: 751-756.
- [53] Stenhoff J, Dahlback B, Hafizi S. (2004) Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 319: 871-878.
- [54] Sasaki T, Knyazev PG, Cheburkin Y, Gohring W, Tisi D, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E. (2002) Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains. *J Biol Chem*, 277: 44164-44170.
- [55] Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Gohring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E. (2006) Structural basis for Gas6-Axl signalling. *Embo J*, 25: 80-87.
- [56] Cummings CT, Deryckere D, Earp HS, Graham DK. (2013) Molecular Pathways: MERTK Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res*, 19: 5275-5280.
- [57] Caberoy NB, Zhou Y, Li W. (2010) Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *Embo J*, 29: 3898-3910.
- [58] Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W. (2012) Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J Cell Physiol*, 227: 401-407.
- [59] Faust M, Ebensperger C, Schulz AS, Schleithoff L, Hameister H, Bartram CR, Janssen JW. (1992) The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene*, 7: 1287-1293.
- [60] O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. (1991) axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 11: 5016-5031.
- [61] Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlbäck B, Carmeliet P. (2001)

- Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*, 7: 215-221.
- [62] Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, Serke S, Siegert W, Snodgrass HR, Huhn D. (1994) Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*, 84: 1931-1941.
- [63] Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, Kessler H, Lammers R, Ullrich A, Bartram CR, Janssen JW. (1997) Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*, 14: 2619-2631.
- [64] Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. (1995) The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol*, 15: 614-625.
- [65] Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov VA, Berk BC. (2004) Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 279: 28766-28770.
- [66] Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, Burchert A, McCloskey P, Spizz G, Varnum B, Der C, Liu ET. (1996) Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 16: 135-145.
- [67] Hafizi S, Alindri F, Karlsson R, Dahlback B. (2002) Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. *Biochem Biophys Res Commun*, 299: 793-800.
- [68] Allen MP, Zeng C, Schneider K, Xiong X, Meintzer MK, Bellosta P, Basilico C, Varnum B, Heidenreich KA, Wierman ME. (1999) Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. *Mol Endocrinol*, 13: 191-201.
- [69] Valverde P. (2005) Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 333: 180-185.

- [70] Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. (1999) Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*, 18: 4224-4236.
- [71] Demarchi F, Verardo R, Varnum B, Brancolini C, Schneider C. (2001) Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem*, 276: 31738-31744.
- [72] Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD. (2004) Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: 6.
- [73] Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. (2005) Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood*, 105: 1970-1976.
- [74] Sharif MN, Sosic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN, Ivashkiv LB. (2006) Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med*, 203: 1891-1901.
- [75] Korshunov VA. (2012) Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clin Sci*, 122: 361-368.
- [76] O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. (1995) The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem*, 270: 551-557.
- [77] Ito M, Nakashima M, Nakayama T, Ohtsuru A, Nagayama Y, Takamura N, Demedchik EP, Sekine I, Yamashita S. (2002) Expression of receptor-type tyrosine kinase, Axl, and its ligand, Gas6, in pediatric thyroid carcinomas around chernobyl. *Thyroid*, 12: 971-975.
- [78] Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC. (2002) Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8: 361-367.
- [79] Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG. (1995) Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer*, 60: 791-797.

- [80] Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW. (2005) Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*, 7: 1058-1064.
- [81] Tsou AP, Wu KM, Tsen TY, Chi CW, Chiu JH, Lui WY, Hu CP, Chang C, Chou CK, Tsai SF. (1998) Parallel hybridization analysis of multiple protein kinase genes: identification of gene expression patterns characteristic of human hepatocellular carcinoma. *Genomics*, 50: 331-340.
- [82] Hector A, Montgomery EA, Karikari C, Canto M, Dunbar KB, Wang JS, Feldmann G, Hong SM, Haffner MC, Meeker AK, Holland SJ, Yu J, Heckrodt TJ, Zhang J, Ding P, Goff D, Singh R, Roa JC, Marimuthu A, Riggins GJ, Eshleman JR, Nelkin BD, Pandey A, Maitra A. (2010) The Axl receptor tyrosine kinase is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther*, 10: 1009-1018.
- [83] Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read TA, Erber R, Ullrich A. (2006) Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5799-5804.
- [84] Gjerdrum C, Tiron C, Høiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, Collett K, Li S, McCormack E, Gjertsen BT, Micklem DR, Akslen LA, Glackin C, Lorens JB. (2010) Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 1124-1129.
- [85] Sayan AE, Stanford R, Vickery R, Grigorenko E, Diesch J, Kulbicki K, Edwards R, Pal R, Greaves P, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M, Kriajevska M, Mellon JK, Dhillon AS, Tulchinsky E. (2012) Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL. *Oncogene*, 31: 1493-1503.

- [86] Bartolomei MS, Webber AL, Brunkow ME, Tilghman SM. (1993) Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene. *Genes Dev*, 7: 1663-1673.
- [87] Carlone DL, Skalnik DG. (2001) CpG binding protein is crucial for early embryonic development. *Mol Cell Biol*, 21: 7601-7606.
- [88] Carlone DL, Lee JH, Young SR, Dobrota E, Butler JS, Ruiz J, Skalnik DG. (2005) Reduced genomic cytosine methylation and defective cellular differentiation in embryonic stem cells lacking CpG binding protein. *Mol Cell Biol*, 25: 4881-4891.
- [89] Mudduluru G, Ceppi P, Kumarswamy R, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H. (2011) Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene*, 30: 2888-2899.
- [90] Wu YM, Robinson DR, Kung HJ. (2004) Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64: 7311-7320.
- [91] Thiery JP. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2: 442-454.
- [92] Polyak K, Weinberg RA. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9: 265-273.
- [93] Ishikawa M, Sonobe M, Nakayama E, Kobayashi M, Kikuchi R, Kitamura J, Imamura N, Date H. (2013) Higher expression of receptor tyrosine kinase Axl, and differential expression of its ligand, Gas6, predict poor survival in lung adenocarcinoma patients. *Ann Surg Oncol*, 20: 012-2795.
- [94] Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, Erdmann R, Heuser M, Waizenegger JS, Riecken K, Binder M, Schewe D, Sawall S, Witzke V, Cubas-Cordova M, Janning M, Wellbrock J, Fehse B, Hagel C, Krauter J, Ganser A, Lorenz JB, Fiedler W, Carmeliet P, Pantel K, Bokemeyer C, Loges S. (2013) Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*, 122: 2443-2452.

- [95] Rankin EB, Fuh KC, Taylor TE, Krieg AJ, Musser M, Yuan J, Wei K, Kuo CJ, Longacre TA, Giaccia AJ. (2010) AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res*, 70: 7570-7579.
- [96] Gustafsson A, Martuszezwska D, Johansson M, Ekman C, Hafizi S, Ljungberg B, Dahlback B. (2009) Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin Cancer Res*, 15: 4742-4749.
- [97] Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, Duan M, Torneros A, Yu J, Heckrodt TJ, Zhang J, Ding P, Apatira A, Chua J, Brandt R, Pine P, Goff D, Singh R, Payan DG, Hitoshi Y. (2010) R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 70: 1544-1554.
- [98] Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009) Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene*, 28: 3442-3455.
- [99] Mo R, Tony Zhu Y, Zhang Z, Rao SM, Zhu YJ. (2007) GAS6 is an estrogen-inducible gene in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 353: 189-194.
- [100] Ma PC. (2012) Personalized targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Cleve Clin J Med*, 79 Electronic Suppl 1: eS56-60.
- [101] Howe LR, Brown PH. (2011) Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4: 1149-1157.
- [102] Ratushny V, Astsaturov I, Burtness BA, Golemis EA, Silverman JS. (2009) Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Cell Signal*, 21: 1255-1268.
- [103] Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*, 16: 1647-1655.
- [104] Yarden Y, Sliwkowski MX. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 127-137.

- [105] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J*, 19: 3159-3167.
- [106] Mendelsohn J, Baselga J. (2006) Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol*, 33: 369-385.
- [107] Katzel JA, Fanucchi MP, Li Z. (2009) Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*, 2: 2.
- [108] Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivass V, Au V, LaFramboise T, Abdel-Rahman M, Wang X, Levine AD, Rho JK, Choi YJ, Choi CM, Kim SW, Jang SJ, Park YS, Kim WS, Lee DH, Lee JS, Miller VA, Arcila M, Ladanyi M, Moonsamy P, Sawyers C, Boggon TJ, Ma PC, Costa C, Taron M, Rosell R, Halmos B, Bivona TG. (2012) Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet*, 44: 852-860.
- [109] Hong J, Peng D, Chen Z, Sehdev V, Belkhiri A. (2013) ABL regulation by AXL promotes cisplatin resistance in esophageal cancer. *Cancer Res*, 73: 331-340.
- [110] Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, Shen L, Fan Y, Giri U, Tumula PK, Nilsson MB, Gudikote J, Tran H, Cardnell RJ, Bearss DJ, Warner SL, Foulks JM, Kanner SB, Gandhi V, Krett N, Rosen ST, Kim ES, Herbst RS, Blumenschein GR, Lee JJ, Lippman SM, Ang KK, Mills GB, Hong WK, Weinstein JN, Wistuba II, Coombes KR, Minna JD, Heymach JV. (2013) An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res*, 19: 279-290.
- [111] Macleod K, Mullen P, Sewell J, Rabiasz G, Lawrie S, Miller E, Smyth JF, Langdon SP. (2005) Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*, 65: 6789-6800.
- [112] Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. (2007) A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 26: 3909-3919.

- [113] Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE. (2008) Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*, 268: 314-324.
- [114] Gioia R, Leroy C, Drullion C, Lagarde V, Etienne G, Dulucq S, Lippert E, Roche S, Mahon FX, Pasquet JM. (2011) Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood*, 118: 2211-2221.
- [115] Huang F, Hurlburt W, Greer A, Reeves KA, Hillerman S, Chang H, Fargnoli J, Graf Finckenstein F, Gottardis MM, Carboni JM. (2010) Differential mechanisms of acquired resistance to insulin-like growth factor-1 receptor antibody therapy or to a small-molecule inhibitor, BMS-754807, in a human rhabdomyosarcoma model. *Cancer Res*, 70: 7221-7231.
- [116] Lay JD, Hong CC, Huang JS, Yang YY, Pao CY, Liu CH, Lai YP, Lai GM, Cheng AL, Su IJ, Chuang SE. (2007) Sulfasalazine suppresses drug resistance and invasiveness of lung adenocarcinoma cells expressing AXL. *Cancer Res*, 67: 3878-3887.
- [117] Giles KM, Kalinowski FC, Candy PA, Epis MR, Zhang PM, Redfern AD, Stuart LM, Goodall GJ, Leedman PJ. (2013) Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther*, 12: 2541-2558.
- [118] Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S, Eastham-Anderson J, Kallop D, Weimer R, Wu Y, Pei L. (2010) An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene*, 29: 5254-5264.
- [119] Qi W, Cooke LS, Stejskal A, Riley C, Croce KD, Saldanha JW, Bearss D, Mahadevan D. (2009) MP470, a novel receptor tyrosine kinase inhibitor, in combination with Erlotinib inhibits the HER family/PI3K/Akt pathway and tumor growth in prostate cancer. *BMC Cancer*, 9: 1471-2407.

- [120] Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM. (2009) Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res*, 69: 6871-6878.
- [121] Qian F, Engst S, Yamaguchi K, Yu P, Won KA, Mock L, Lou T, Tan J, Li C, Tam D, Lougheed J, Yakes FM, Bentzien F, Xu W, Zaks T, Wooster R, Greshock J, Joly AH. (2009) Inhibition of tumor cell growth, invasion, and metastasis by EXEL-2880 (XL880, GSK1363089), a novel inhibitor of HGF and VEGF receptor tyrosine kinases. *Cancer Res*, 69: 8009-8016.
- [122] Liu L, Shi H, Liu Y, Anderson A, Peterson J, Greger J, Martin AM, Gilmer TM. (2011) Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 10: 518-530.
- [123] Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, Szabadkai I, Daub H, Keri G, Ullrich A. (2008) AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res*, 68: 1905-1915.
- [124] Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, Ahmed S, Redaelli S, Piazza R, Magistroni V, Andreoni F, Scapozza L, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. (2006) In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res*, 66: 11314-11322.
- [125] Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. (2009) Imatinib and beyond--exploring the full potential of targeted therapy for CML. *Nat Rev Clin Oncol*, 6: 535-543.
- [126] Schroeder GM, An Y, Cai ZW, Chen XT, Clark C, Cornelius LA, Dai J, Gullo-Brown J, Gupta A, Henley B, Hunt JT, Jeyaseelan R, Kamath A, Kim K, Lippy J, Lombardo LJ, Manne V, Oppenheimer S, Sack JS, Schmidt RJ, Shen G, Stefanski K, Tokarski JS, Trainor GL, Wautlet BS, Wei D, Williams DK, Zhang Y, Zhang Y, Fargnoli J, Borzilleri RM. (2009) Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yl)oxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the Met kinase superfamily. *J Med Chem*, 52: 1251-1254.

- [127] Szokol B, Gyulavári P, Kurkó I, Baska F, Szántai-Kis C, Greff Z, Orfi Z, Peták I, Péntes K, Torka R, Ullrich A, Órfi L, Vántus T, Kéri G. (2014) Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 5: 298-303.
- [128] Choi YL, Bocanegra M, Kwon MJ, Shin YK, Nam SJ, Yang JH, Kao J, Godwin AK, Pollack JR. (2010) LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res*, 70: 2296-2306.
- [129] Mackiewicz M, Huppi K, Pitt JJ, Dorsey TH, Ambs S, Caplen NJ. (2011) Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res Treat*, 130: 663-679.
- [130] Campbell MR, Amin D, Moasser MM. (2010) HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 16: 1373-1383.
- [131] Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonnetterre J, Peyrat JP. (2008) ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the biopathological features and prognosis. *Ann Oncol*, 19: 73-80.
- [132] Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N. (2011) AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*, 19: 58-71.
- [133] Chakrabarty A, Sanchez V, Kuba MG, Rinehart C, Arteaga CL. (2012) Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 2718-2723.
- [134] Myatt SS, Lam EW. (2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 847-859.
- [135] Hynes NE, Lane HA. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5: 341-354.
- [136] Blobel CP. (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 32-43.

- [137] Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. (1999) Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 6235-6240.
- [138] Borrell-Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. (2003) TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *Embo J*, 22: 1114-1124.
- [139] Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C, Lorens JB, Ivaska J. (2011) Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 30: 1436-1448.
- [140] Tan DS, Haaland B, Gan JM, Tham SC, Sinha I, Tan EH, Lim KH, Takano A, Krisna SS, Thu MM, Liew HP, Ullrich A, Lim WT, Chua BT. (2014) Bosutinib inhibits migration and invasion via ack1 in kras mutant non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 13: 1476-4598.
- [141] Subramaniam V, Vincent IR, Gardner H, Chan E, Dhamko H, Jothy S. (2007) CD44 regulates cell migration in human colon cancer cells via Lyn kinase and AKT phosphorylation. *Exp Mol Pathol*, 83: 207-215.
- [142] Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, Boileau G, Papandreou CN, Giancotti FG, Knudsen B, Nanus DM. (2000) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*, 106: 1399-1407.
- [143] Guan H, Zhou Z, Gallick GE, Jia SF, Morales J, Sood AK, Corey SJ, Kleinerman ES. (2008) Targeting Lyn inhibits tumor growth and metastasis in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Ther*, 7: 1807-1816.
- [144] Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, Talpaz M. (2003) BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*, 101: 690-698.
- [145] Dos Santos C, Demur C, Bardet V, Prade-Houdellier N, Payrastre B, Recher C. (2008) A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood*, 111: 2269-2279.

- [146] Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, Watamoto K, Emi N, Abe A, Kiyoi H, Towatari M, Naoe T. (2007) Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia*, 21: 403-410.
- [147] Defilippi P, Di Stefano P, Cabodi S. (2006) p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol*, 16: 257-263.
- [148] Geiger B. (2006) A role for p130Cas in mechanotransduction. *Cell*, 127: 879-881.
- [149] Sanchez-Bailon MP, Calcabrini A, Gomez-Dominguez D, Morte B, Martin-Forero E, Gomez-Lopez G, Molinari A, Wagner KU, Martin-Perez J. (2012) Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Signal*, 24: 1276-1286.
- [150] Vultur A, Buettner R, Kowolik C, Liang W, Smith D, Boschelli F, Jove R. (2008) SKI-606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 7: 1185-1194.
- [151] Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE. (2003) The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8933-8938.
- [152] Zaczek A, Brandt B, Bielawski KP. (2005) The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol*, 20: 1005-1015.
- [153] Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. (2005) Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?. *J Clin Oncol*, 23: 7350-7360.
- [154] Holzel M, Bovier A, Tuting T. (2013) Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance?. *Nat Rev Cancer*, 13: 365-376.
- [155] Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S. (2009) Crosstalk to stromal fibroblasts

- induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 15: 6630-6638.
- [156] Vlaicu P, Mertins P, Mayr T, Widschwendter P, Ataseven B, Hogel B, Eiermann W, Knyazev P, Ullrich A. (2013) Monocytes/macrophages support mammary tumor invasivity by co-secreting lineage-specific EGFR ligands and a STAT3 activator. *BMC Cancer*, 13: 1471-2407.
- [157] Wen D, Peles E, Cupples R, Suggs SV, Bacus SS, Luo Y, Trail G, Hu S, Silbiger SM, Levy RB, Koski RA, Lu HS, Yarden Y. (1992) Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell*, 69: 559-572.
- [158] Cote GM, Miller TA, Lebrasseur NK, Kuramochi Y, Sawyer DB. (2005) Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res*, 311: 135-146.
- [159] Hedhli N, Huang Q, Kalinowski A, Palmeri M, Hu X, Russell RR, Russell KS. (2011) Endothelium-derived neuregulin protects the heart against ischemic injury. *Circulation*, 123: 2254-2262.
- [160] De Boeck A, Pauwels P, Hensen K, Rummens JL, Westbroek W, Hendrix A, Maynard D, Denys H, Lambein K, Braems G, Gespach C, Bracke M, De Wever O. (2013) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut*, 62: 550-560.
- [161] Shibuya M, Komi E, Wang R, Kato T, Watanabe Y, Sakai M, Ozaki M, Someya T, Nawa H. (2010) Measurement and comparison of serum neuregulin 1 immunoreactivity in control subjects and patients with schizophrenia: an influence of its genetic polymorphism. *J Neural Transm*, 117: 887-895.
- [162] Lee CY, Lin Y, Bratman S, Feng W, Kuo A, Scheeren F, Engreitz JM, Varma S, West R, Diehn M. (2013) Neuregulin autocrine signaling promotes self-renewal of breast tumor-initiating cells by triggering HER2/HER3 activation. *Cancer Res*, 31: 31.
- [163] Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, Cachola KE, Murray JC, Tihan T, Jensen MC, Mischel PS, Stokoe D, Pieper RO. (2007) Loss of

- tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*, 13: 84-88.
- [164] Eitel JA, Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Murphy MP, Pollok KE, Mayo LD. (2009) PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells. *Cell Cycle*, 8: 896-901.
- [165] Conradt L, Godl K, Schaab C, Tebbe A, Eser S, Diersch S, Michalski CW, Kleeff J, Schnieke A, Schmid RM, Saur D, Schneider G. (2011) Disclosure of erlotinib as a multikinase inhibitor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia*, 13: 1026-1034.

11. Saját publikációk jegyzéke

1. Torka R, **Pénzes K**, Gusenbauer S, Baumann C, Szabadkai I, Órfi L, Kéri G, Ullrich A. (2014) Activation of HER3 Interferes with Antitumor Effects of Axl Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Suggestion of Combination Therapy. *Neoplasia*, 16:(4) 301-318.
IF: 5,398
2. Szokol B, Gyulavári P, Kurkó I, Baska F, Szántai-Kis Cs, Greff Z, Órfi Z, Peták I, **Pénzes K**, Torka R, Ullrich A, Órfi L, Vántus T, Kéri G. (2014) Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 5: 298-303.
IF: 3,073
3. **Pénzes K**, Christine B, Szabadkai I, Órfi L, Kéri Gy, Ullrich, Robert T. (2014) Combined inhibition of AXL, Lyn and p130Cas kinases block migration of triple negative breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 15:(11) 1571-1582.
IF: 3,630

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Kéri Györgynek a belém fektetett bizalmat és hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, és támogatta. Külön köszönettel tartozom azért, hogy a külföldi tanulmányomat megszervezte és tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak és Prof. Dr. Mandl Józsefnek, az SE Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet vezetőinek, hogy lehetőséget adtak, hogy az intézet PhD hallgatójaként védhetem meg a doktori disszertációm.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Axel Ullrichnak, hogy a müncheni Max Planck Intézet Molekuláris Biológia részlegének igazgatójaként lehetőséget adott PhD munkám megvalósításához és biztosította számomra a szakmai fejlődés lehetőségét.

Jelen munka nem jöhetett volna létre, Dr. Robert Torka segítségével nélkül, aki időt és fáradságot nem kímélve mindig végig mellettem állt, támogatott, motivált és mind elméleti, mind gyakorlati kérdésekben hasznos tanácsokkal látott el.

Hálával tartozom Dr. Pintér Istvánnak, hogy bízott bennem, ezen a pályán elindított, és barátilag mindig támogatott.

Külön köszönöm Gyulavári Pálnak, hogy energiát és időt nem sajnálva segített az adatok kiértékelésében, és kritikusan véleményezte a doktori disszertációm.

Köszönet jár Órfi Zoltánnak, Christine Baumannak és Vijay Ulaganathannak a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom a Max Plank Intézet Molekuláris Biológia részlegének és az MTA-Pathobiokémiai kutatócsoport tagjainak baráti támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom páromnak, hogy türelmesen viselte a hosszú távolléteimet, kitartott mellettem, biztatott és a növényeim gondját viselte.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani szüleimnek, testvéreimnek, hogy bátorítottak és támogattak, minden nehézségben mellettem álltak.

13. Függelék

13.1. A megbízott cégek által végzett kísérletek rövid ismertetése

13.1.1. Cellular Profiling assay, sejtalapú profiling assay

A cellular profiling assay-t Hs578T sejtvonal lizátumon a Kinaxo (Martinstried, Németország) végezte a cég standard protokollja szerint. Az assay részletes leírása Contract et. al. 2010-es publikációjában megtalálható [165].

13.1.2. Millipore Kináz Profiler assay

A tirozin kináz inhibitorok további tesztelését a Millipore cég végezte a honlapján (<http://www.millipore.com/techpublications/tech1/pf3036>) található előírások alapján. Az inhibitorok gátlási képességét 1 μM -os koncentrációban, 84 tirozin kinázon vizsgálták.

13.1.3. Kináz szelektivitás vizsgálat

A kináz szelektivitás profiling assay-eket (**14.1.3.1.-14.1.3.3**) a Proteros biostruktúra GmbH (Németország) végezte a cég standard előírásai alapján. A kinázok százalékos inhibíciós százalékát az IMAP, kötő- és HTRF assay-kben kapott értékek alapján számolták ki.

13.1.3.1. IMAP assay

Az IMAP assay (Molecular Devices) alapelve, hogy a floreszcensen jelölt szubsztrát peptidet a kináz foszforilálja. A reakciót követően a hozzáadott detektáló oldatban levő

nanorészecskéken rögzített fémionokhoz nagy affinitással kötődik a foszfát csoport. Ez a kötődés lecsökkenti a szubsztrátmolekula szabadsági fokainak számát, amit a detektált fény FP értékét megváltoztatja. Ezzel az assay-vel a következő kinázok aktivitását vizsgáltuk: Abl, AKT1, Aurora A, AXL, CDK2, CDK4, CHK1, c-Kit, c-Met, CSK, FGFR3, FLT3, IKK- β , InsR, IRAK4, JAK3, JNK1, ERK1, PAK1, PAK4, PDGFR- β , PIM1, PKC- α , Plk3, Ret, Rock2, c-Src, Syc, Tie2, TrkA, VEGFR2 és ZIPK.

13.1.3.2. Kötődés assay (Binding assay)

Ebben az assay-ben a vizsgált kinázhoz egy ún. „reporter” próbát kötnek, ami optikus szignál kibocsájtást eredményez. Azok az inhibitorok, amelyek kötődnek a fehérjék azon részéhez ahol a reporter próbák találhatóak, elmozdítják a próbát és ez által az optikus jel lecsökken. A próba elmozdítása százalékban van megadva. A 100%-os jel a kináz hiányát, míg a 0%-os jel az inhibitor hiányát jelzi. Ebben az assayben a következő kinázok voltak megvizsgálva: BRAF, DDR1 és mTOR.

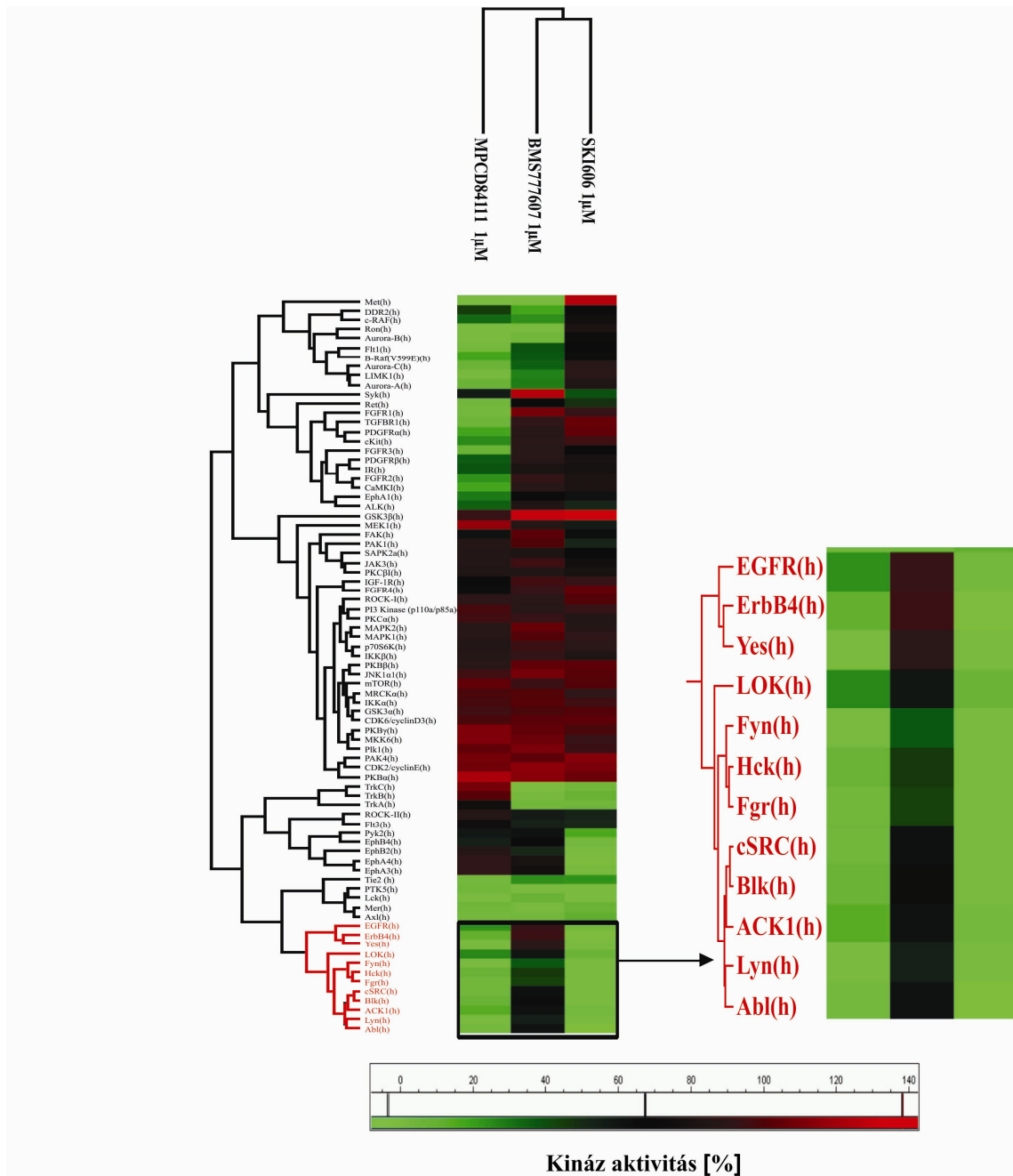
13.1.3.3. HTRF assay

Ez az assay egy enzimatis és egy detektáló lépésből álló kompetitív immunoassay. Az assay során a natív ADP és a d2-jelölt ADP verseng az Eu³⁺ kriptáttal jelölt monoklonális ADP ellenes antitestért. Ezzel az assay-vel a HER2 kináz aktivitását vizsgáltuk.

13.2. A megbízott cégek által végzett kísérletek eredményeinek táblázata és ábrái

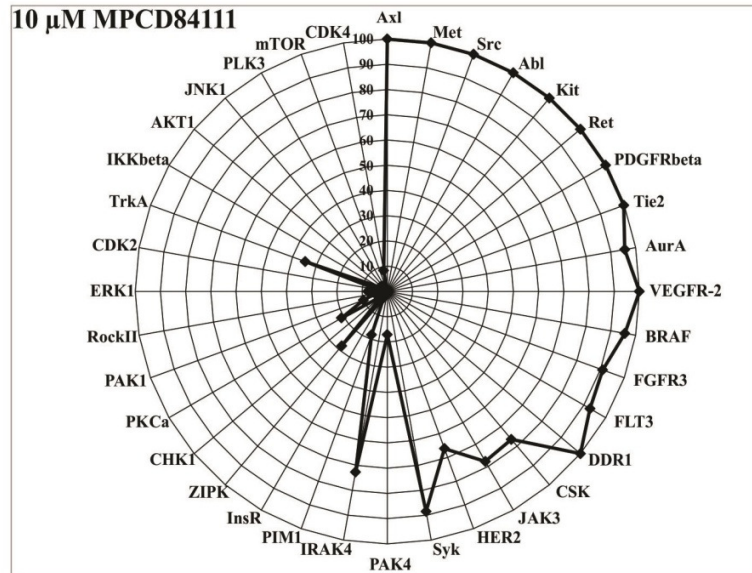
A		B	
Fehérjék nevei	SKI606	Fehérjék nevei	MPCD84111
ABL1	0.00018	ABL1	0.155
ACVR1/ALK2	>11.47	ACVR1	0.263
AURKA	>10.03	AURKA	4.424
AURKB	>14.92	AURKB	0.087
AXL	0.8	AXL	0.036
BMPR2	2.99	BRAF	0.263
CaMK2 γ	5.85	CAMK4	8.104
CaMK2 δ	> 6	CSK	1.567
CDK1	> 12.1	DDR1	0.155
CDK5	> 11.07	DDR2	2.888
CDKL5	>10.46	EIF2AK4/GCN2	0.916
CK1 α	14.46	FAK	5.616
CK1 δ	4.94	FER	1.265
CK1 ϵ	3.89	FYN	2.355
CLIK1	0.052	LIMK1	0.094
CSK	0.08	LOK	6.697
DDR2	4.68	LYN	0.217
EphA2	0.002	MAP3K11/MLK3	2.196
EphA5	0.008	MAP3K2	8.006
EphB2	0.173	MAP3K3	>10.979
EphB3	4.34	MAP3K4/MEKK4	10.077
EphB4	0.008	MAP4K2	1.062
FAK	0.92	MAP4K3	2.526
FER	0.53	MAP4K4/NIK	7.94
FRK	0.147	MAP4K5/KHS1	0.023
FYN	0.0008	MARK2	12.371
GAK	0.0086	MARK3	7.664
GSK3 α	>10.12	MET	0.067
GSK3 β	>8.42	MINK1	1.735
ICK	>7.83	MST1/STK4	4.542
ILK	>2.57	MST2/STK3	>7.4109
JAK1	>14.76	PDGFRB	1.226
LYN	0.00018	PLK4	0.237
MAP2K1	0.116	PRKAA1	0.977
MAP2K2	0.106	PRKAA2	4.748
MAP2K3	2.614	RIPK2	0.208
MAP2K6	2.81	SRC	0.422
MAP3K1	0.034	TAOK1	3.412
MAP3K2	0.018	TAOK2	2.09
MAP3K4	2.59	TGFBR1	0.16
MAP4K2/GCK	0.0087	TGFBR2	4.377
MAP4K3/GLK/KH2	0.018	TNK2	6.867
MAP4K4/HGK	0.22	YES1	0.264
MAP4K5/KHS1	0.00078	ZAK	0.59
MER	9.41		
MINK1	0.106		
MLK3	14.35		
MST1	3.57		
MST2	12		
MYT1	0.965		
p38/MAPK14	13.47		
PFK1	9.66		
PKA α	>12.62		
PKA β	>14.82		
PKC α	> 8.04		
PKC δ	5.72		
PKC ϵ	>13.05		
QIK	0.281		
QSK	0.64		
RPS6KA1	>13.17		
SLK	0.3		
SRC	0.00018		
TBK1	5.38		
TNK2/ACK	0		
TYK2	13.42		
ULK3	5.89		
VRK2	> 6.7		
YES1	0.0029		
ZAK	0.55		

Függelék 1. táblázat. Az MPCD84111 és az SKI606 inhibitorok target profilja. A táblázatban az SKI606 (A) és az MPCD84111 inhibitorokkal kezelt Hs578T sejtvonal lizátum fehérjéinek a K_d értéke van feltüntetve.



Függelék 1. ábra. AXL tirozin kináz inhibitorokkal kezelt kinázok kontrollhoz mért százalékos aktivitásának összehasonlító „hő térképe” (heat map)

A „hő térkép” 1 µM MPCD84111, BMS777607 és SKI606 inhibitorokkal kezelt 84 kináz %-os aktivitását ábrázolja. A skálán látható színek a kináz aktivitást jelzik.



Függelék 2. ábra. Az MPCD84111-es kináz szelektivitási profilja

Az MPCD84111 inhibitor kináz szelektivitási profilját három különböző kináz assay-vel határoztuk meg. A kinázok százalékos aktivitása három párhuzamos kísérlet értékei alapján lettek kiszámolva.