

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

Doktori tézisek

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. Töröcsik 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

1. Bevezetés

Az orvostudomány egyik legnagyobb kihívása a daganatos betegségek kezelése. Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a rosszindulatú daganatsejteket olyan DNS hibák, mutációk hozzák létre, amelyek bizonyos jelátviteli útvonalak szabályozása révén hozzájárulnak a daganatsejtek növekedéséhez, túléléséhez és terjedéséhez. A daganatok kezelése eddig szinte kizárólag konvencionális kezelési eszközökkel (kemoterápia, sugárkezelés) történt, de ma már az eredményességének köszönhetően a célzott terápiát széles körben használják. Számos potenciális célpont közül a tirozin kinázok bizonyultak a legmegfelelőbb célpontnak, mivel ezek közül sokan a hibás jelátviteli utak részvevői, valamint gyógyszerezhetőek. Éppen ezért a jelenleg FDA által törzskönyvezett monoklonális antitest és kis molekulású kináz gátló többsége tirozin gátló.

1.1. Az AXL receptor tirozin kináz mint tumorterápiás célpont szerepe a daganatokban

Az AXL receptor tirozin kináz a TAM receptor tirozin kináz család egyik tagja. A Gas6 kötődése a receptor extracelluláris részéhez elősegíti annak aktivációját, amely kiváltja a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK), foszfátidil inozitol 3 kináz (PI3K), AKT és a NF-KB (Nuclear Factor Kappa B). jelút vonalak aktivációját. AXL overexpresszióját számos daganat fajtából kimutatták, mint pl. emlő, gyomor, prosztata, tüdő, petefészek, vastagbél, máj és glioma. AXL overexpressziója mozgékonyással, invázióval és szegényes prognózissal van összefüggésben. AXL receptor tirozin kináz expresszióját és aktivációját már számos gyógyszer rezisztens daganatos sejtvonalban megfigyelték, mint pl. Lapatinib rezisztens HER2 pozitív emlőtumoros sejtvonalakban, Imatinib rezisztens gasztrointestinális sztróma tumorokban, Erlotinib rezisztens fej-nyaki daganatos

sejtvonalakban és Nilotinib rezisztens krónikus leukémia sejtekben. Ezek a megállapítások arra engednek következtetni, hogy AXL receptor tirozin kináz egy ígéretes célpont a daganat elleni harcban. Az ismert AXL célzó stratégiák közül a specifikusan AXL-t gátló kis molekulású inhibitorok használata a legígéretesebb és jól megalapozott. A legtöbb kis molekulású inhibitor eredetileg más célpontra volt tervezve, de szintúgy hatékonyan célozzák az AXL-t.

2. Célkitűzések

Habár számos irodalmi adat igazolja AXL tirozin kináz szerepét a daganatos sejtek migrációjában és a gyógyszer rezisztenciában, AXL pontos szerepe a daganatos sejtek migrációjában és a gyógyszer-rezisztencia kialakulásában nyitott kérdés maradt. Doktori munkám első részében az AXL receptor tirozin kinázt célzó kinázgátlók rendkívül agresszív tripla negatív emlődaganat (ösztrogén, progeszteron és HER receptor negatív) sejtvonalak migrációjára gyakorolt hatásával foglalkoztam.

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 az AXL gátlással elért rezisztencia felfüggesztő hatást tanulmányoztam, különös tekintettel más tirozin kináz receptorok aktivációjára.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestem a választ:

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

3. Módszerek

Sejtvonalak

A kísérleteinkben különböző eredetű daganatos sejtvonalat használtunk: emlő (MDA-MB-231, MDA-MB-231-D3H2LN, Hs578T, BT549, MDA-MB-436, MDA-MB-468), glioma (A172, U373, SF126, U118), tüdő (H1975, H1299, H292, A549), hasnyálmirigy (AsPC-1, BxPC3, Capan2), petefészek (Ovcar8, Scov3), méhnyakrák (C4-I) és fibroblaszt (NIH/3T3).

Inhibitorok és ligandok

A Lapatinib, az SKI606 és az MPCD84111-es inhibitorokat a Vichem Chemie Kutató Kft. szintetizálta, míg a BMS777607-es és R428 inhibitorokat a LDC Discovery GmbH-től (Dortmund, Németország) kaptuk. A Herceptin és Erbitux monoklonális antitesteket a martinsriedi Max-Planck Gyógyszertárból vásároltuk. A rekombináns humán NRG1 (#396-HB-050) és Batimastat (BB94, #2961) az R&D Systems, GmbH, Németországi fiókjából szereztük be.

RNS interferencia

A kísérlet során különböző gén specifikus AXL, Lyn, Met, EGFR, HER2, HER3 és p130Cas siRNA használtunk. Kontrollként Ambion kontroll # 1 siRNA használtuk. 120000 sejtet 6 lyukú platre raktunk, majd 24 órás inkubációt követően a sejteket 48 óráig 40 nM-os végkoncentrációban siRNS-el kezeltük. A Lipofectamine RNAiMAX-ot a gyártó előírásai alapján használtuk.

Sejtviabilitás és migrációs assay

A sejtek viabilitását a gyártó előírásai alapján CellTiter-Glo assayvel vizsgáltuk meg.

A sejtek motilitását Boyden kamrás assayvel határoztuk meg. 8 μ M pórus nagyságú Boyden kamra felső osztattában 50000 ezer sejtet tettünk ki. A kamra alsó osztattában kemoattraktánsként 1%-os FCS-t

tartalmazó médiumot helyeztünk. 3.5 órás inkubációt követően a membránon átmigrált sejteket fixáltuk és megszámloltuk.

SDS PAGE és Western blot analízis

A mintákat 12 % akrilamid koncentrációjú gélen választottuk el, nitrocellulóz membránra blottoltuk és NET zselatinnal blokkoltuk. A membránokat foszfo-Lyn (Tyr507), foszfo -Src (Tyr 416), foszfo -Pyk (Tyr 580), foszfo FAK (Tyr576/577), foszfo p130Cas (Tyr 410), foszfo HER3 (Y1289), foszfo HER2 (Y1248), EGFR, foszfo AKT (S473), HER2 ,HER3 , Met és Tubulin elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A HRP-kötött kecske anti-nyúl és kecske anti-egér másodlagos antitesteket 1:10,000 hígításban használtuk. A kötött antitesteket ECL szubsztrát reakcióval detektáltuk és Hyperfilm ECL filmmel exponáltuk

Humán foszfo-RTK array

A human foszfo-RTK array-t a gyártó előírásai alapján végeztük el. A membránokat 500 µg fehérjét tartalmazó mintával inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az előhívás erősített kemoluminenszcenciával történt

Immunoprecipitáció

A HER2 és HER3 antitesteket A-sepahorose gyöngyökhöz kötöttük. A lizátumokat a kötött antitestekkel 4 °C-on 16 óráig inkubáltuk. A precipitátumokat Western blottal elemeztük.

3D szferoid kultúra

A Matrigel™ Matrix Basement membránt 3 mg/ml koncentrációjúra hígítottuk. A sejteket a kirakást követően inhibitorokkal kezeltük.

Kvantitatív PCR

Az MDA-MB-231-es sejteket jelzett időpontok szerint 10 µM BMS777607-el vagy DMSO-val kezeltük. Az RNS és a specifikus egy szálú cDNS szintézise a cég/ gyártó ajánlásai alapján történt. A cDNS szintéziséhez, 1µg teljes RNS-t és 200 ng radom hexamer primert használtunk. A PCR-t a gyártó ajánlásai alapján StepOnePlus készüléken futattuk.

Foszfo-AXL ELISA

Az éheztetett sejteket 1 óráig inhibitorral kezeltük, majd 30 percig 250 ng/ml Gas6-al stimuláltuk. A 96 lyukú plateket 2 µg/ml koncentrációjú AXL ellenes (klón 259/2, IgG1 izotípus) vontuk be. A sejtlizátumokat 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A floreszcens szignál detektálásához az alkaline foszfatáz AttoPhos Substrate Set-et használtuk. 90 perc inkubáció után a detektálás 430 excitációs és 560 nm emissziós hullámhosszon történt.

NRG1-ELISA és Foszfo-AKT S473 ELISA

A humán NRG1-ELISA és a Pan AKT-specifikus ELISA kitet pár módosítással a gyártó előírásai alapján használtuk. A lizátumokat a biotinilált detekciós specifikus antitesttel való inkubációt követően szoba hőmérsékleten Alkaline Foszfatazzal Konjugált Streptavidin SA110 oldattal inkubáltuk. A floreszcens szignál detektálásához az alkaline foszfatáz AttoPhos Substrate Set-et használtuk. 90 perc inkubáció után a detektálás 430 excitációs és 560 nm emissziós hullámhosszon történt.

Az adatok kiértékelése és statisztikai analízis

A kísérleteket legalább háromszor ismételtük meg. Az IC₅₀ értékeket a DMSO kontroll sejtekhez viszonyított százalékos értékben adtuk meg és XLfit 5.1.0 szoftverrel (IDBS, Surrey, UK) ábrázoltuk. 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 $*** = p < 0.001$.

4. Eredmények

4.1. Az AXL tirozin kináz inhibitorok hatása a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációjára

Azért, hogy meghatározzuk két potenciális (BMS777607 és SKI606) és egy szabadalmaztatott (MPCD84111) AXL tirozin kináz inhibitor hatását az AXL foszforilációjára, három olyan tripla negatív emlődaganatos sejtvonalat (MDA-MB-231, Hs578T and BT549) választottuk amelyek expresszálják az AXL-t. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az AXL tirozin kináz inhibitorok hatását az AXL foszforilációjára, a sejteket 1 óráig különböző inhibitor koncentrációkkal kezeltük, majd 30 percig Gas6 stimuláltuk. Azt találtuk, hogy az inhibitorok különböző koncentrációkban gátolják az AXL foszforilációját. Az AXL tirozin kináz foszforilációját leghatékonyabban a BMS777607 inhibitor gátolta, melyet az MPCD84111 és SKI606 követett. Az AXL foszforiláció gátlására legérzékenyebben a Hs578T sejtvonala reagált. Az AXL tirozin kináz gátlók sejt migráció gátló hatását a Boyden kamrás assay-vel határoztuk meg. A membránon átmigrált sejteket 3.5 órás inkubációt követően számoltuk meg. Az inhibitorok migráció gátló IC₅₀ értékeinek az

összehasonlítása után, azt találtuk, hogy mindhárom sejtvonalba az SKI606 migráció gátló IC_{50} a legkisebb.

A Hs578T sejt vonal az MDA-MB-231 és BT549 sejt vonalakhoz képest kevésbé volt érzékeny a kináz inhibitor kezelésekre.

Ahhoz, hogy meghatározzuk az AXL tirozin kináz inhibitorok hatását a viabilitásra, a sejteket 10 pontos felezési sor megfelelő koncentrációjával kezeltük, a lumineszcens jelt 72 órás inkubációt követően mértük meg.

Az SKI606 és az MPCD84111 szignifikánsan gátolta a Hs578T és BT549 sejt vonalak viabilitását, míg a BMS777607 viabilitás gátló IC_{50} értékei Hs578T sejtekben $9.43 \mu\text{M}$ és BT549 sejtekben $> 10 \mu\text{M}$ volt. Az MDA-MB-231-es sejt vonal viabilitását a kináz inhibitor kezelése nem befolyásolták szignifikánsan, ugyanis az SKI606 viabilitás gátló IC_{50} értéke $3.20 \mu\text{M}$, az MPCD84111 viabilitás gátló IC_{50} értéke $8.50 \mu\text{M}$ és a BMS777607 viabilitás gátló IC_{50} értéke nagyobb volt, mint $10 \mu\text{M}$.

Mivel a sejtviabilitás és migráció gátlás IC_{50} koncentrációi magasabbak voltak, mint az AXL aktivitás gátlás IC_{50} koncentrációi, ezért arra következtetünk, hogy az inhibitorok migráció és viabilitás gátló hatása nem függ az AXL receptor tirozin kináz aktivitásától. Ahhoz, hogy megértsük, hogy a BMS777607-hez képest az SKI606 és az MPCD84111 inhibitorok miért gátolják jobban a tripla negatív sejt vonalak migrációját, Hs578T sejt lizátumán alapuló célmolekula profilíng assay-vel meghatároztuk az inhibitorok célmolekula profilját. Mivel a BMS777607 inhibitor célmolekula profilját már korábban Schroeder et al. publikációjában leírták, ezért csak az SKI606 és az MPCD84111-es inhibitorok célmolekula profilját határoztuk meg a fent említett assay-ben. A Cellular assay eredmények rámutattak arra, hogy az SKI606 és az MPCD84111 közösen gátolják a SRC kináz tagjait, a Lyn-t, Src-ot és Yes kinázokat.

Az inhibitorok target profilja alapján, 84 kinázt választottunk ki, ahhoz hogy tovább jellemezzük a három AXL tirozin kináz inhibitor gátlási potenciálját. A profiler kináz assay adatai alátámasztották korábbi megállapításunkat, mivel az SKI606 és az MPCD84111 kezelése

hatékonyan gátolták a SRC kináz család tagjait és néhány más kinázt (Abl, PTK5, EGFR, ErbB4, Lok, Tie2).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az SKI606 és az MPCD84111 migráció gátló hatékonysága annak tudható be, hogy gátolják a SRC család tagjait. Az SKI606 és az MPCD84111-es által célzott/támadott SRC család tagjai közül Lyn tirozin kináz mind a három tripla negatív sejtvonalban overexpresszált. Ennek az adatnak a tudatában választottuk ki a Lyn tirozin kinázt és a sejtmigrációban fontos szerepet játszó állványfehérjét, a p130Cas-t, azért, hogy megvizsgáljuk, hogy milyen szerepet töltenek be a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációjában és viabilitásában. A Lyn és a p130Cas géncsendesítése szignifikánsan lecsökkentette a tanulmányozott sejtvonalak migrációját. A Lyn géncsendesítése nem befolyásolta a Hs578T és az MDA-MB-231 sejtvonalak viabilitását. A BT549 sejtvonal viabilitását az összes géncsendesítési kezelés gátolta.

Ahhoz, hogy jellemezzük az AXL inhibitorok migrációs jeltovábbítási útvonalakra kifejtett hatását, az éheztetett sejteket 1 μ M koncentrációjú SKI606, BMS777607 és MPCD84111-es inhibitorokkal kezeltük 1.5 és 48 óráig. A Western blototos eredmények bizonyították korábbi megállapításunkat, mivel mindhárom sejtvonalban az SKI606 és az MPCD84111 gátolták a Pyk, FAK, p130Cas és Lyn foszforilációját. Míg a BMS777607 nem befolyásolta szignifikánsan ezen kinázok foszforilációját.

4.2. Az AXL gátlás hatása más tirozin kináz receptorok aktivációjára

Munkánk második részében az AXL célzó terápia más receptor tirozin kináz foszforilációjára gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az első lépésben foszfo AXL ELISA assayvel a BMS777607 AXL foszforiláció gátló hatását validáltuk. Az AXL gátlás hatását van más receptor tirozin kináz aktivitásának a mintázata, Humán Foszfo RTK array határoztuk

meg. Az AXL fehérjét specifikus AXL siRNS-el, míg az AXL aktivitását 1 μ M BMS777607 kezeléssel gátoltuk le.

Mindkét kezelés gátolta az AXL és a Met foszforilációját, míg a HER3 foszforilációja szignifikánsan megnövekedett. Ezt az eredményt specifikus AXL siRNS és BMS777607 kezelést használva, immunoprecipitációval és Western blottal is alátámasztottuk.

A következő lépésben megvizsgáltuk a Met hatását a HER3 foszforilációjára, mivel BMS777607 Met gátlóként is ismert. Az MDA-MB-231-es sejtvonalon végzett specifikus Met siRNS kezelés, a kontroll kezeléshez viszonyítva nem okozott semmilyen változást a HER3 foszforilációjában. Ez az eredmény kizárja a Met részvételét a foszfo HER3 indukciójában. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a HER3 aktivációját más AXL-t expresszáló sejtvonalban, 10 μ M BMS777607 legátoltuk az AXL aktivitását. Érdekes módon a HER3 foszforilációja egyedül az MDA-MB-231-es és az Ovar8 sejtvonalban volt látható.

Hogy tovább jellemezzük az AXL gátlás után bekövetkező HER3 indukcióját, 20 AXL-t expresszáló agy, emlő, petefészek, méhnyak, tüdő és hasnyálmirigy eredetű sejtvonalat választottunk. Mivel az AXL gátlása hatással van az AKT jeltovábbítására, ezért az AXL gátlása után, AKT ELISA assayvel ellenőriztük az AKT S473 foszforilációját. A HER3 foszforilációját a Western blottal határoztuk meg.

Az eredmények egy pozitív korrelációra világítottak rá az AXL gátlás után bekövetkező HER3 indukciója és az alacsony bazális AKT S473 foszforiláció között. Az AXL gátlás utáni HER3 mRNS szintjét, kvantitatív PCR-al határoztuk meg. A szignifikáns HER3 indukció már 16 óráig 10 μ M BMS777607-el kezelt sejtekben nyilvánvaló volt. A maximális HER3 mRNS növekedést 48 órás kezelés után detektáltuk. Habár az MDA-MB-231-es sejtekben a NRG1 mRNS-e detektálható volt, kizártuk annak lehetőségét, hogy a NRG1 mRNS expressziója lenne felelős a HER3 aktivációjáért.

Ezután NRG1 ELISA assay-vel meghatároztuk a BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtek felülészó médiumának a NRG1 fehérje szintjét. Érdekes módon a 10 μ M BMS777607-el kezelt MDA-MB-231 sejtek

felülúszó médiumában NRG1 szintje az időfüggő módon csökkent. Továbbá ahogy a NRG1 fehérje szintje csökkent úgy a HER3 foszforilációja erősödött, arra utalva, hogy létezik egy szoros korreláció a HER3 aktivációja és a NRG1 között.

Mivel bizonyítottuk, hogy a BMS777607 által legátolt AXL indukálja a foszfo HER3-at, kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a mechanizmus más AXL inhibitorokra jellemző-e.

Éppen ezért összehasonlítottuk a BMS777607 hatását az R428 valamint az MPCD84111 AXL inhibitorokhoz. Az inhibitorok AXL gátló hatását AXL ELISA assay-vel validáltuk.

A BMS777607-el és R428-al végzett kezelések az MDA-MB-231-es sejtekben indukálták a HER3 foszforilációját, míg az MPCD84111 nem. Ezzel párhuzamosan mindhárom AXL inhibitor kezelés hatására a HER3 fehérje szintje szignifikánsan megemelkedett. Ahhoz, hogy megértsük, hogy ellentétben a BMS777607-el az MPCD84111 miért gátolja a HER3 foszforilációját, megvizsgáltuk az MPCD84111 kináz szelektivitási profilját. Azt találtuk, hogy az MPCD84111 egyedülálló módon gátolja a HER2 foszforilációja, a HER3 receptor lehetséges dimerizációs partnerét.

Ez az eredmény a HER2-t expresszáló MCF7-es sejtvonalban is validáltuk. Habár a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak alacsony HER2 szinttel rendelkeznek, azt feltételeztük, hogy az MDA-MB-231-es sejtvonalban is a HER3 a HER2-vel dimerizál. Ahhoz, hogy ezt a feltételezésünknek érvényt szerezzünk, megvizsgáltuk a BMS777607 és Erbitux vagy Herceptin vagy Lapatinib vagy Batimastat való kombinációs kezelések hatását a HER3 foszforilációjára.

Mint a Herceptinnel vagy Lapatinibbel vagy Batimastattal történt kombinációs kezelések gátolták a HER3 foszforilációját, míg az Erbituxal való kombinációs kezelés nem gátolja a HER3 foszforilációját.

Ezek az eredmények bizonyítják, hogy még a tripla negatív emlődaganatos sejtvonalakban is a HER2 a HER3 dimerizációs partnerre.

Ahhoz, hogy ezt a megállapítást megerősítsük az MDA-MB-231-es sejteket 24 óráig 10 μ M BMS777607-el kezeltük, és hogy tovább erősítsük a HER2 foszforilációját a kezelt sejteket 50 ng/ml NRG1-el stimuláltuk. A Her2 foszforilációját 2 mg fehérjét tartalmazó mintából immunoprecipitációval határoztuk meg. Bár elég nagy mennyiségű fehérjét-mintát használtunk, a HER2 foszforilációja csekély mértékben volt látható, de reprodukálható volt. Ez az eredmény alátámasztotta a korábbi megállapításunkat.

Mivel a Lapatinib ismert EGFR/HER2 kettős gátló, ezért szerettük volna tisztázni az EGFR hatását a HER3 foszforilációjára.

Éppen ezért a sejteket EGFR, HER2, HER3 és HER2/EGFR fehérjéket specifikus siRNS-ekkel kezeltük, majd sejteket további 24 óráig 10 μ M BMS777607-el inkubáltuk ahhoz, hogy a HER3 foszforilációját előidézzük.

Érdekes módon csak a kontroll siRNS kezelésekhöz képest csak a EGFR és HER2 kombinációs siRNS kezelések gátolták le teljesen a HER3 foszforilációját. Ez az eredmény arra utal, hogy nemcsak HER2 hanem az EGFR is fontos a HER3 foszforilációjában. Habár 1 μ M BMS777607-s kezelés után az AKT S473 szint nem regenerálódott, a HER3 expressziója és foszforilációja nyilvánvaló volt, arra utalva, hogy az AXL/PI3K/AKT jelút vonal a HER3 reaktivációjához vezet. Ismert, hogy a HER3 aktivációja támogatja a túlélési és proliferációs út vonalakat, ami korlátozhatja az AXL inhibitorok hatékonyságát.

Ahhoz ezt a hipotézist alátámasztjuk az MDA-MB-231-es sejteket BMS777607-el kezeltük, majd 72 órás inkubációt követően a sejtek viabilitását CellTiter Glo assayvel lemértük. A kezeletlen sejtekhez képest az 50 ng/ml NRG1 stimuláció kompenzálta az 1 μ M BMS777607-el kezelt sejtek viabilitását. Ez az adat alátámasztja a hipotézisünket miszerint a HER aktiváció kompenzálja az AXL/PI3K/AKT út vonal gátlását. Ez az eredményt 3D szferoid Matrigel teszt rendszert használva MDA-MB-231 és Ovcar8 sejt vonalakon is bebizonyítottuk.

3D szferoid Matrigel teszt rendszer segítségével BMS777607 és Lapatinibbel különböző kombinációs kezeléseket végeztünk. Az egyszeri inhibitor kezelésekhöz képest az 1 μM BMS777607 és 5 μM Lapatinib kombinációs kezelések szignifikánsan csökkentették a sejtek viabilitását. Ezt az eredményt AXL és HER3 specifikus siRNA kettős géncsendesítéssel is bizonyítottuk, ami arra utal, hogy egyidejű AXL és HER2/3 komplex gátlása szükséges ahhoz, hogy elkerüljük az AXL inhibitorokkal szembeni rezisztenciát.

5. Következtetések

- Kimutattuk, hogy a legagresszívebb típusú, tripla negatív emlődaganatos sejtvonalak migrációját hatékonyan csak azok az AXL tirozin kináz inhibitorok gátolták, amelyek a Lyn kinázt és a p130Cas állványfehérjét gátolták
- Az eredményeinkből arra lehet következtetni, 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, és 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 és HER2/HER3 komplex együttes célzó terápia szükséges

6. Saját publikációk jegyzéke

1. Torka R, **Pénzes K**, Gusenbauer S, Baumann C, Szabadkai I, Örfi 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, Örfi Z, Peták I, **Pénzes K**, Torka R, Ullrich A, Örfi 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, Örfi 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