

Terápiás célpontok preklinikai vizsgálata mellkasi daganatokban

Doktori értekezés

Berta Judit

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Döme Balázs PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Hegedűs Balázs PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Szőke János PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Lendvai Gábor PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Kerényi Tibor PhD, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Moldvay Judit PhD, egyetemi docens
Dr. Czebe Krisztina PhD, osztályvezető főorvos

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2 BEVEZETÉS.....	8
2.1 Mellkasi daganatok: tüdőrák és malignus pleurális mesothelioma	8
2.1.1 Mellkasi daganatok molekuláris patológiája.....	9
2.1.2 Standard kemoterápia mellkasi daganatok esetében	11
2.1.3 Célzott terápiák mellkasi daganatokban.....	12
2.1.4 Angiogenesis és angiogén faktorok mellkasi daganatokban.....	14
2.1.5 Tumor-indukált lymphangiogenesis és a lymphangiogén növekedési faktorok	15
2.2 Az apelinerg rendszer	16
2.2.1 Az apelin receptor és ligandjának jellemzése	16
2.2.2 Az apelinerg rendszer élettani szerepe	19
2.2.3 Az apelinerg rendszer jelátviteli útvonalai.....	21
2.2.4 Az apelinerg rendszer gátlása.....	22
2.2.5 Az apelinerg rendszer szerepe az angiogenesis folyamatában.....	23
2.2.6 Az apelinerg rendszer szerepe daganatokban.....	24
2.2.7 Az apelinerg rendszer szerepe a nyirokércépződés folyamatában.....	25
3 CÉLKITŰZÉSEK.....	26
4 MÓDSZEREK.....	28
4.1 Beteganyag.....	28
4.2 Sejtvonalak.....	30
4.3 Stabil transzfektáns sejtvonalak létrehozása.....	30
4.4 Hatóanyagok, gyógyszerek	31
4.5 Antigénkimutatási módszerek.....	31
4.5.1 Immuncitokémia az apelin és receptora (APJ) expressziójának meghatározására humán NSCLC vonalakon és humán nyirok endotél sejteken	31
4.5.2 Sejtes apelin szekréció vizsgálata NSCLC vonalakban	32
4.5.3 Immunhisztokémia az apelin protein expresszió és a mikroér-sűrűség meghatározására humán és xenograft tumorokban	32

4.5.4 Apelin és receptora expressziójának kimutatása reverz transzkripciós PCR-rel	33
4.6 <i>In vitro</i> tesztek	35
4.6.1 Sejtproliferációs teszt	35
4.6.2 Szferoid növekedési assay	36
4.6.3 Migrációs teszt humán nyirok endotél sejtekkel	37
4.6.4 Endotél cső esszé humán nyirok endotél sejtekkel	37
4.6.5 Apoptózis indukció a humán nyirok endotél sejteken	38
4.6.6 Western blot vizsgálat humán nyirok endotél sejtekkel	38
4.7 <i>In vivo</i> vizsgálatok	38
4.7.1 Xenograft tumorok	38
4.8 Statisztikai módszerek	39
5 EREDMÉNYEK.....	39
5.1 Apelin mRNS és protein expresszió vizsgálata humán NSCLC sejtvonalakban .	39
5.2 Az apelin és APJ expresszió összehasonlítása NSCLC vonalak 2D-s és 3D-s tenyészeiben	42
5.3 Apelin mRNS és protein expresszió vizsgálata NSCLC betegek tumoros és normál tüdőszövet mintáiban	44
5.4 Exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatása az NSCLC vonalak növekedésére <i>in vitro</i>	47
5.5 Fokozott apelin expresszió hatása az NSCLC növekedésére <i>in vivo</i>	50
5.6 Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlító vizsgálata.....	54
5.7 A megnövekedett apelin protein expresszió prognosztikus jelentősége.....	55
5.8 Az APJ receptor kifejeződésének vizsgálata humán nyirok endotél sejtvonalon kvantitatív PCR-rel és immuncitokémiával	57
5.9 Apelin hatásának vizsgálata a humán nyirok endotél sejtekre <i>in vitro</i>	59
5.10 Mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitásának jellemzése és az mTOR gátlás hatása a szferoidképzésre.....	68
6 MEGBESZÉLÉS	71
7 KÖVETKEZTETÉSEK.....	78
8 ÖSSZEFOGLALÁS	79

9 IRODALOMJEGYZÉK	81
10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	99
11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	100

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE2	angiotenzin konvertáló enzim II (angiotensin converting enzyme 2)
ADC	adenocarcinoma
ALK	anaplasztikus limfóma kináz (anaplastic lymphoma kinase)
AMP	adenozin-5'-monofoszfát (adenosine-5'-monophosphate)
AMPK	AMP-aktivált protein kináz (AMP-activated protein kinase)
Ang-II	angiotenzin II (angiotensin II)
APJ	apelin receptor
AT1	angiotenzin 1-es receptor (angiotensin receptor type 1)
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
BrdU	5-bróm-2'-deoxiuridin (5-bromo-2'-deoxyuridine)
CHO	kínai hörcsög petefészek (Chinese hamster ovary)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DMF	dimetilformamid (dimethylformamide)
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dUTP	2'-deoxiuridin-5'-trifoszfát (2'-deoxyuridine-5'-triphosphate)
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
ERK	extracelluláris szignál regulált kináz (extracellular signal-regulated kinase)
ET-1	endothelin-1
FCS	fötális borjú savó (fetal calf serum)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
HIV-1	emberi immunhiányt okozó vírus-1 (human immunodeficiency virus 1)
GPCR	G-protein kapcsolt receptor (G protein coupled receptor)
GTP	guanozin-trifoszfát (guanosine triphosphate)
HGF	hepatocyta eredetű növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HIF-1α	hypoxia indukálható faktor-1 α (hypoxia inducible factor-1 α)
HRE	hypoxia érzékeny elem (hypoxia response element)

HUVEC	humán köldökzsínór véna endotél sejtek (human umbilical vein endothelial cells)
IGF	inzulinszerű növekedési faktor (insulin like growth factor)
IL-8	interleukin-8
KRAS	Kirsten patkány szarkóma virális onkogén homológ gén (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog gene)
LCC	nagysejtes carcinoma (large cell carcinoma)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz (mitogen activated protein kinase)
MMP	mátrix metalloproteáz (matrix metalloproteinase)
MPM	malignus pleurális mesothelioma (malignant pleural mesothelioma)
mTOR	rapamycin emlős targetje (mammalian target of rapamycin)
MVD	mikroér sűrűség (microvessel density)
NF2	2-es típusú neurofibromatózis gén (neurofibromatosis type 2)
NF-κB	nukleáris faktor-kappa B (nuclear factor kappa B)
NSCLC	nem-kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer)
PBS	foszfát pufferelt só (phosphate buffered saline)
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
P-Glu	pyroglutamil (pyroglutamyl)
PI3K	foszfoinozitol-3-kináz (phosphatidylinositol 3-kinase)
PKC	protein kináz C (protein kinase C)
PLC	foszfolipáz C (phospholipase C)
Plcg2	foszfolipáz C-gamma 2 (phospholipase C-gamma 2)
PIGF	placenta-eredetű növekedési faktor (placental growth factor)
PTEN	foszfatáz és tenzin homológ gén (phosphatase and tensin homolog gene)
Pyr1	pyroglutamát-1 (pyroglutamate 1)
SCC	laphámrák (squamous cell carcinoma)
SCID	súlyos kombinált immunhiány (severe combined immunodeficiency)
SCLC	kissejtes tüdőrák (small cell lung cancer)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
STAT	szignál transzducer és transzkripciós aktivátor (signal transducer and activator of transcription)
TGF-β	transzformáló növekedési faktor β (transforming growth factor β)

Tie2	2-es típusú tirozin kináz immunglobulinszerű és EGF-szerű doménekkal (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1)
TNFα	tumor nekrosis faktor α (tumor necrosis factor α)
TUNEL	terminális deoxinukleotidil transzferáz közvetített végjelölés dUTP-vel (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
VEGF	vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR-3	vaszkuláris endotéliális növekedési faktor receptor-3 (vascular endothelial growth factor receptor 3)
YAP	Yes-asszociált protein (Yes-associated protein)

2 BEVEZETÉS

2.1 Mellkasi daganatok: tüdőrák és malignus pleurális mesothelioma

A tüdőrák világszerte jelentős egészségügyi problémát jelent, az összes daganatos megbetegedés 13%-áért (1,6 millió eset), illetve a daganat okozta halálozások 18%-áért (1,4 millió eset) volt felelős 2008-ban (Jemal 2011). A tüdőrák fő szövettani típusai a tüdő különböző sejtes kompartmenjeiből származtathatóak. Körülbelül 15%-uk a hörgő neuroendokrin sejtjeiből ered, ez a kissejtes tüdőrák (SCLC) (Coulson 2003). Ez a típus majdnem kizárólagosan dohányzókban alakul ki, és egy agresszív klinikai viselkedésű rosszindulatú daganat (Lassen 1995), amely nagy hajlandóságot mutat visszaesésre (Govindan 2006). Lokalizált formái az egyik mellkasfélre korlátozódnak, a mediastinumot és a supraclaviculáris nyirokcsomókat érinthetik. A kiterjedt stádiumú kissejtes tüdőrákok ezeket a határokat átlépik, illetve távoli metasztázisokat adnak (Pfister 2004). A tüdőrákok nagyobb hányada, 85%-a azonban nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) (Govindan 2006). Szövettanilag ez a csoport 3 fő altípusra osztható. A planocelluláris carcinomák többsége laphámrák (SCC), amelyek a bazális vagy neuroendokrin sejtekből származnak. Az adenocarcinóma (ADC) sejtek a hörgőcskék Clara-sejtjeinek progenitorjaiból vagy a légúti nyálkahártya 2-es típusú pneumocytaiból erednek. A nagysejtes carcinóma (LCC) pedig egy heterogén csoportot alkot, amelyet a mikroszkópban látott jellemző különbségek alapján kizárhatunk a kissejtes carcinóma, az SCC, az ADC vagy a tüdőrákok más specifikusabb szövettani típusai közül (Torok 2011).

A mellkasi daganatok másik típusa a malignus pleurális mesothelioma (MPM), amely egy rendkívül magas letalitással bíró rosszindulatú megbetegedés. A mellhártya üregének savós hártárával borított rétegét érinti, és a superficiális mesothelialis sejtekből fejlődik (Whitaker 1982). Az MPM szoros kapcsolatban áll az azbeszttel való érintkezéssel, és egyes esetekben 20-40 évig terjedő lappangási periódust mutathat (Lanphear 1992). Előfordulásának növekedésére lehet számítani a következő évtizedekben: a becslések szerint Európában 250 ezer ember halálozása várható MPM okozta megbetegedésből kifolyólag az elkövetkező 30 évben, és 2500-3000 új eset kerülhet diagnosztizálásra minden évben az Egyesült Államokban (Peto 1999).

Ráadásul bizonyos országok még mindig nagy mennyiségben használnak azbesztet, kiemelkedő mértékben Oroszország, Kína, Kazahsztán, Brazília és Kanada (Scherpereel 2010). Az MPM betegek várható medián túlélése mindössze 4-12 hónap a diagnózistól számolva (Pass 2001; Zucali 2006).

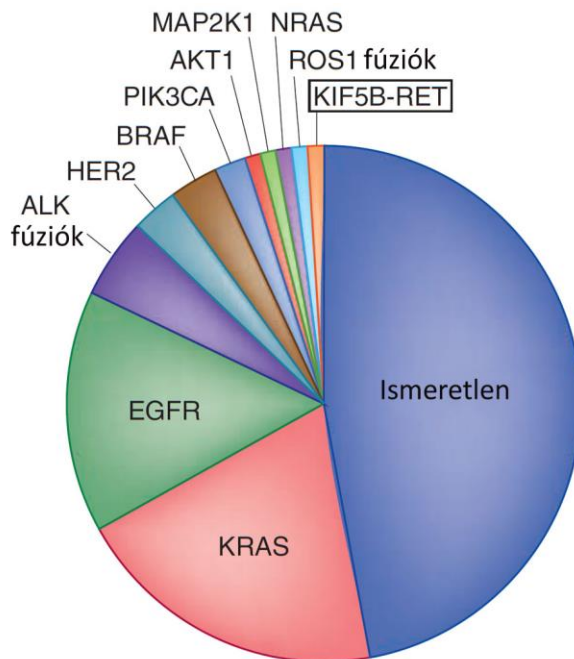
2.1.1 Mellkasi daganatok molekuláris patológiája

Molekuláris markerek tekintetében jelenleg 3 gén expressziójának van kulcsszerepe az NSCLC prognosztikájában és predikciójában; az EGFR, a KRAS és az ALK gének státuszának (1. ábra; Gyula 2012).

Az EGFR gén több mutációját leírták NSCLC esetében (Gaughan 2011). A mi földrészünkön az EGFR gén mutációja az adenocarcinoma csoportban 15-20%-ra tehető, a gén amplifikációja pedig 10%-os gyakoriságú (Gyula 2012). Az EGFR mutációi onkogének, amelyek aktiválják az EGFR jelátviteli útvonalat a ligand jelenlétében, és így serkentik az EGFR közvetítette túlélési és antiapoptotikus jeleket a PI3K/AKT, ERK/MAPK és STAT molekulákon keresztül (Sharma 2007). Az EGFR gén tirozinkináz domén kódoló szakaszának mutációi közül a leggyakoribbak a 19-es és a 21-es exon hibái. Ezek között dominálón a 19-es exon deléciója fordul elő (a 746-753 régióban), de gyakori a 21-es exon 858-as kodonjának a pontmutációja is. Ezek a génhibák egyértelműen aktiváló mutációk (Gyula 2012).

A Ras család tagjainak mutációja gyakori humán daganatokban; NSCLC esetén, az adenocarcinoma csoportban a KRAS mutáció gyakorisága 25-30%. A mutáns KRAS protein konstitutívan köti a GTP molekulát, amelyik aktiválja a MEK/ERK és PI3K/AKT jelátviteli útvonalak célmolekuláit. NSCLC mintákban a KRAS mutáció általában kölcsönösen kizárja az EGFR mutáció és az ALK transzlokáció jelenlétét (Roberts 2010; Gyula 2012).

Az ALK gén hibája az adenocarcinomák egy kis csoportjában fordul elő, ez az EML4-ALK fúziós gén keletkezését jelenti, hazánkban még ismeretlen (Gyula 2012). Klinikai jelentősége lehet még a MET onkogén amplifikációjának, amely az adenocarcinoma alcsoportban néhány százalékos gyakorisággal mutatható ki (Gyula 2012).



1. ábra

Molekuláris markerek tüdő adenocarcinómában. Az egyes szeletek a klinikailag releváns mutációk százalékos megoszlását mutatják (Pao 2012).

Az MPM kialakulásában fontos prediktív tényező, az azbeszt rákkeltő hatásának molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert. Az MPM hosszú lappangó periódusa alatt számos pathogenetikai esemény bekövetkezhet, amelyek hozzájárulnak a betegség kialakulásához. Összehasonlítva más sejttípusokkal, a humán mesotheliális sejtek nagyon érzékenyek az azbeszt citotoxicitásra (Yang 2008). A mesotheliális sejtek azbeszt expozícióra adott válaszában a tumor nekrosis faktor-alpha (TNF- α) és NF- κ B jelátvitelnek jut kritikus szerep (Yang 2006).

MPM esetén a 22-es kromoszómavesztés gyakran előforduló esemény (Spugnini 2006). Ez a genetikai módosulás okozza az MPM esetek 40-50%-ában az ezen a kromoszómán elhelyezkedő 2-es típusú neurofibromatózis gén (NF2) és transzlációs terméke, az ún. Merlin molekula expressziójának hiányát. Az aktivált Merlin protein, az emlős ún. Hippo jelátviteli kaszkád tagjaként, elnyomja a YAP transzkripcionális koaktivátor molekula aktivitását. Amennyiben azonban inaktiválódik mutáció következtében a mesothelioma sejtekben, a YAP molekula sejtproliferációra és az MPM sejtek túlélésére gyakorolt pozitív hatása érvényesülni tud (Sekido 2010).

Az egyik legfontosabb onkogén jelátviteli útvonal a PI3K/AKT/mTOR út. Ennek effektor molekulája, az mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), amely alapvető sejtes folyamatok szabályozásában játszik szerepet, így gén transzkripcióban, protein transzlációban és citoskeleton szerveződésben (Faivre 2006; Rini 2008). Fontosabb jelátviteli célpontja az S6-kináz (p70S6K), az S6 riboszomális fehérje és a 4EBP1 molekula, amelyek olyan hatékony proto-onkogének transzlációjában játszanak szerepet, mint amilyen a c-MYC és Cyclin D (Faivre 2006; Mita 2003). Ennek megfelelően a patológiás mértékben aktivált mTOR sokféle onkogén funkciót mediál, mint amilyenek a megnövekedett sejtproliferáció, a fokozott túlélési potenciál és az apoptózis rezisztencia (Mita 2003). Több preklinikai vizsgálat számol be ennek az útvonalnak az elsődleges szerepéről NSCLC sejtvonalak esetében is (Marinov 2007). Az AKT molekula aktivációjáról és az mTOR foszforilációjáról számolnak be NSCLC betegekből származó minták 51%-ában és NSCLC sejtvonalak 74%-ában (Balsara 2004). Számos tanulmányban írnak mesothelioma sejtek esetében is a PI3K/AKT/mTOR útnak a hiperaktivációjáról különböző mechanizmusok által. A malignus mesothelioma esetek kb. 10%-ában ennek az útnak az aktivációja a PTEN gén homozigóta deléciójának köszönhető (Suzuki 2009).

2.1.2 Standard kemoterápia mellkasi daganatok esetében

NSCLC-ben szenvedő betegek számára a jelenlegi standard kezelés jó performance-státusz esetén a platina-bázisú kemoterápia a harmadik generációs szerek (gemcitabin, vinorelbin, taxán, pemetrexed) valamelyikével kombinálva (Pfister 2004). E kettős kombinációk használata mellett javultak a betegek tünetei és életminőségük. A várható medián túlélés 3-4 hónapról 8-10 hónapra, az 1 éves túlélés aránya 10%-ról 30-40%-ra nőtt (Schiller 2002).

MPM-ben szenvedő betegek esetében agresszív citoreduktív terápia, amely magában foglalja a sebészeti beavatkozást (extrapleurális pneumonectómia), kemo- és sugárterápiával kombinálva, korai stádiumban, meghosszabbítja ugyan a várható túlélést (Sugarbaker 1996), azonban a leghatékonyabb kemoterápiás kezelés (pemetrexed/cisplatin) esetén is ez csak pár hónapos javulást jelent a medián túlélésben (9 hónapról 12 hónapra való növekedés) (Vogelzang 2003). A fő problémát ezen

rosszindulatú daganatos megbetegedés esetében is a tumorsejtek szerzett rezisztenciája jelenti, amely a terápia sikertelenségéhez vezet (Jackman 2009).

2.1.3 Célzott terápiák mellkasi daganatokban

A daganatsejtek gyakori kemoterápiával szembeni rezisztenciájának következtében, bár több vizsgálat is irányult a kemoterápiás szerek különböző dózisban, módon, illetve kombinációban való alkalmazására, úgy tűnik, hogy a citotoxikus kezeléssel a terápiás hatékonyság tovább már nem javítható. Az utóbbi években ezért a figyelem a célzott terápiák felé fordult, és egyértelműen megfogalmazódott az igény új biológiai célpontok találására a minél hatékonyabb kezelés érdekében. Ilyen lehetséges célpontok egyrészt egyes kismolekulákkal vagy ellenanyagokkal gátolható onkogén fehérjék (pl. EGFR vagy ALK), másrészt a haem- és lymphangiogenesis, melyek a különböző szolid tumorok progressziójának alapvető mechanizmusai.

Így NSCLC esetében az EGFR receptor és a VEGF-A citokin molekula fontos kezelési célpontok (Kurie 1996; Bremnes 2006). A gefitinib (Iressa; Astrazeneca Pharmaceuticals, Wilmington, USA) és erlotinib (Tarceva; Genentech Inc., San Francisco, USA) olyan kismolekulájú reverzibilis EGFR tirozin-kináz gátlók, amelyek gátolják az EGFR közvetítette jelátviteli kaszkádokat. A törzskönyvi előirat szerint a gefitinib EGFR-aktiváló mutációt hordozó, lokálisan előrehaladott és távoli, hematogén metasztázist adó NSCLC-ben javasolt első, másod- vagy harmadvonalbeli kezelésként. Az erlotinib kezelés javulást eredményezhet lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus NSCLC-ben szenvedő betegek állapotában az első vonalbeli platina bázisú kemoterápia sikertelenségét követően. A 2011 augusztusában született újabb törzskönyvi előírás szerint azonban az erlotinib első vonalbeli kezelésként is javasolt EGFR-aktiváló mutáció pozitív, lokálisan előrehaladott vagy metasztatizáló NSCLC-ben szenvedők kezelésére (Moldvay 2012). A cetuximab és a panitumumab pedig olyan monoklonális antitestek, amelyek az EGFR molekula extracelluláris ligand-kötő doménjéhez kötődve fejtik ki hatásukat (Pennel 2009). A bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche, San Francisco, USA) egy humanizált monoklonális antitest, amely a VEGF-A-hoz kötődik, ezáltal gátolva a VEGF ligand-receptor kötést. Az antivaszkuláris gyógyszerek közül a bevacizumabot engedélyezték elsőként NSCLC kezelésére. A bevacizumab kezelést platina-bázisú kemoterápiával kombinálva, 2007 augusztusában hagyta jóvá az Európai

Gyógyszerügynökség (EMA, European Medicine Agency), mint első vonalbeli kezelést az előrehaladott állapotú NSCLC-ben szenvedő betegek számára (Amir 2009). A bevacizumab azonban kizárólag nem laphámsejtes NSCLC-ben szenvedő és központi idegrendszeri áttéttel nem rendelkező betegeknél alkalmazható. Széleskörű alkalmazását a klinikai vizsgálatokban kapott ellentmondásos eredmények is meggátolják. Paclitaxel-carboplatin kezelés esetén a medián túlélést csak átlagosan 2 hónappal javította, az „AVAiL” (Avastin in Lung) európai vizsgálat adatai szerint pedig az NSCLC betegek teljes túlélése nem javult a bevacizumab gemcitabin-cisplatin kombinációhoz történő hozzáadására (Amir 2008).

A bevacizumabot az antivaszkuláris szereken belül az angioszuppresszív (anti-angiogén) szerek csoportjába soroljuk. A másik nagy csoportba tartoznak (számos ponton átfedésekkel) a VDA (Vascular Disrupting Agents) szerek. Ezek kimondottan a már létező tumor kapillárisokat célozzák meg, ezáltal gyors tumorszövet vérellátási hiányt és másodlagosan a daganatok központi régióiban a tumorsejtek pusztulását okozva, ugyanakkor a perifériás tumor régiók perfúzióját viszonylag érintetlenül hagyják. További előnye ezeknek a szerekeknek, összehasonlítva az angioszuppresszív drogokkal, hogy hatásuk nem függ az adott daganatban végbemenő vaszkularizáció típusától (Amir 2008). Több vaszkulárisan targetált szer klinikai vizsgálata jelenleg is folyik NSCLC-s betegeken. Így ígéretes lehet az 5,6 dimethylxanthenone-4-acetic-acid (DMXAA), a combrestatin A4-foszfát (CA4P) és az ABT-751 terápiás alkalmazása NSCLC-ben (McKeage 2008; <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00653939?cond=nsclc&intr=ca4p&rank=1>; <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00073151?cond=nsclc&intr=abt+751&rank=3>).

A többcélpontú gátlószerek alkalmazása szolid tumorok, és így NSCLC esetében is a célzott terápiák következő generációja lehet. Az EGFR és VEGFR jelátviteli útvonalak kombinált gátlása biztató eredményeket hozott előrehaladott stádiumú NSCLC-vel kezelt betegek esetén (Pennell 2009). Ilyen kettős gátló molekula a vandetanib is, amelynek klinikai tesztelése jelenleg is folyik. Valószínű, hogy laphámsejtes tüdőrákban is hatékony, ami egyértelmű előnyt jelentene a bevacizumabhoz képest (Morabito 2009).

A korábbiakban említettem a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal jelentőségét mind NSCLC, mind MPM esetében. Az mTOR közvetítette jelek támogatják a

kemoterápiával szembeni rezisztenciát, beleértve ebbe a platina bázisú összetevőkkel szembeni rezisztenciát is. Így az mTOR gátlása több daganattípus esetében is kemoszenzitizáló aktivitással bír (Bae-Jump 2009; Beuvink 2005; Georger 2001; Mabuchi 2007). A rapamycin, amit sirolimusként is ismerünk, és ennek analógjai a temsirolimus (CCI-779) és everolimus (RAD001) a mai napig a leginkább vizsgált mTOR gátlók (Faivre 2006; Rini 2008; Mita 2003). Több daganatnál is leírták már *in vitro* és *in vivo* ezen kismolekulák tumorelles aktivitását. A temsirolimust és/vagy everolimust a közelmúltban hagyták jóvá a vesesejtes karcinóma és köpenysejtes limfóma kezelésére (Ciuffreda 2010). NSCLC és MPM esetében is vizsgálták már az mTOR gátlás lehetőségét (Reungwetwattana 2012; Papadimitrakopoulou 2012; Nogová 2009; Buckner 2010), azonban ez a terület még további vizsgálatokat igényel.

2.1.4 Angiogenezis és angiogén faktorok mellkasi daganatokban

A daganatok növekedéséhez és áttétképzéséhez megfelelő vérellátás szükséges. Ezt többféle folyamat képes támogatni. A szolid tumorok biztosíthatják vérellátásukat endotél bimbózással, intusszuszeptív angiogenezissel, a gazdaszövet kisereinek inkorporációjával, posztnatális vaszkulogenezissel, glomeruloid angiogenezissel vagy vaszkuláris mimikriával (Döme 2007). Ez alapján láthatjuk, hogy a tumorok vaszkularizációja egy igen összetett folyamat, mely számos különböző angiogén molekula interakciójának tökéletes összhangját igényli.

Más szolid tumorhoz hasonlóan az NSCLC esetében is az új erek képződése egy komplex folyamatsor eredménye, amely angiogén faktorok hatására következik be. Ezen angiogén molekulák közt kulcsfontosságú a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), de szerepet játszik az angiogenezisben a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), a mátrix-metalloproteázok (MMP-k), az epidermális növekedési faktor (EGF), a placenta-eredetű növekedési faktor (PlGF), az interleukin-8 (IL-8), a hepatocytá-eredetű növekedési faktor (HGF) és az angiopoetinek (Döme 2008).

Az MPM etiológiájában is számos növekedési faktor és citokin szerepét igazolták. Így a TGF- β közreműködhet a tumor növekedés serkentésében, a PDGF szabályozó faktorként hat az MPM sejtek proliferációjára, az IGF-1 és IGF-2 serkenti a

tumor proliferációt és sejt migrációt, az interleukinok, mint például az IL-6 és IL-8, a tumor növekedést és az új kapillárisok fejlődését szabályozzák, a VEGF-ek a tumor érképződésében játszhatnak szerepet, a HGF-nek pedig hatása lehet a mesothelioma sejtek migrációjára és a tumor inváziós képességére (Yang 2008).

2.1.5 Tumor-indukált lymphangiogenezis és a lymphangiogén növekedési faktorok

A tumor-indukált lymphangiogenezis, az új nyirokerek kialakulása, a tumorok érképződéséhez hasonlóan, egy komplex növekedési faktor, citokin és kemokin hálózat által szabályozott folyamat, amely aktívan hozzájárulhat a tumor metasztázis megjelenéséhez (Ji 2006; Saharinen 2004). Több tanulmányban is leírták, hogy *in vivo* kísérletekben a lymphangiogén növekedési faktorok kifejeződése új daganatos nyirokérrendszer kialakulásához vezetett akár intratumorálisan, akár a tumor perifériás területein. Ehhez kapcsolódva a nyirokcsomóáttétek növekvő számáról és egyes esetekben távoli metasztázisok kialakulásáról is beszámoltak (Saharinen 2004; Stacker 2001; Karpanen 2001). Ennek függvényében a lymphangiogén növekedési faktorok tanulmányozása az érdeklődés középpontjába került, mivel ezek a molekulák fontos célpontjai lehetnek a nyirokcsomóáttét kialakulását gátló kezeléseknek. Így az utóbbi évek kutatásainak eredményeként bővült tudásunk a nyirokrendszer fejlődéséről. Több szabályozó molekulát azonosítottak, és kiváló állatmodelleket írtak le. A leginkább tanulmányozott molekuláris mechanizmus, amely a nyirokrendszer fejlődését serkenti, a VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 jelátviteli rendszer: a nyirok endotél sejtek felszínén a szekretált VEGF-C/VEGF-D glikoproteinek aktiválják a VEGFR-3 tirozin kináz receptort (Su 2007). Számos tanulmány ír arról, hogy a VEGF-C és VEGF-D molekulák az embrionális fejlődés során indukálhatják a nyirokér bimbózást és a már létező nyirokerek növekedését, normál és patológiás szövetekben egyaránt (Karkkainen 2004). A VEGF-D ebben a folyamatban a nyirokér denzitást szabályozhatja (Baldwin 2005). Azt is fontos megjegyezni, hogy a VEGF-C/-D molekulák a hemangiogenezist is támogatják a VEGFR-2 aktivációján keresztül (Byzova 2002, Oh 1997).

Bár a VEGFR-3-hoz kapcsolódó jelátvitel kulcsszerepet játszik a nyirokerek növekedésének szabályozásában, további növekedési faktorok és túlélési szignálok széles köre szerepel a lymphangiogenezis szabályozásában és serkentésében: az

angiopoietin-1 és -2, a HGF, a PDGF, az IGF, az FGF, a VEGF-A, az ET-1, a netrin-4, az adrenomedullin és növekedési hormonok (Su 2007, Mumprecht 2009, Karpanen 2008).

2.2 Az apelinerg rendszer

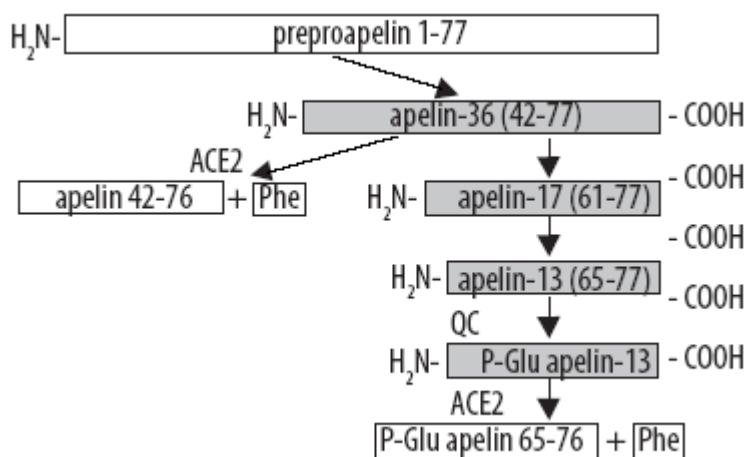
Az utóbbi években így a figyelem középpontjába a molekulárisan célzott terápiák kerültek, köztük a tumorok érhálózatára ható szerek. A minél hatékonyabb antiangiogén szerek fejlesztésének meghatározó lépése az újabban felfedezett angiogén molekulák alapos tanulmányozása. Ezek közé tartoznak az apelinerg jelátviteli rendszer komponensei is (Falcão-Pires 2010).

2.2.1 Az apelin receptor és ligandjának jellemzése

1993-ban, O'Dowd és munkatársai azonosítottak egy 377 aminosav hosszú G-protein kapcsolt receptort (GPCR), amely hét transzmembrán domént tartalmaz, és génje a 11-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. Ez a humán apelin receptor (APJ). A hasonlóság eme receptor és az angiotenzin-1 receptor (AT1) között jelentős: 54%-os a homológia a transzmembrán régiókban (86 aminosav), 30%-os a teljes szekvencia tekintetében (115 aminosav). Azonban fontos hangsúlyozni, hogy az apelin nem kötődik az AT1-hez, mint ahogy az angiotenzin II (Ang-II) sem kötődik az APJ-hez (Falcão-Pires 2010, Ladeiras-Lopes 2008). Ugyanakkor ismert, hogy az APJ ko-receptora a HIV-1 vírusnak (Zhou 2003).

Az apelin receptor ligandját csak 1998-ban azonosították, amikor Tatemoto és munkatársai izoláltak egy 36 aminosav hosszú peptidet szarvasmarha gyomor homogenátumból, mely aktiválta a receptort azt átmenetileg expresszáló kínai hörcsög petefészek sejtekben (Tatemoto 1998). Ezt a peptidet nevezték el apelinnek (APJ endogén ligand). A humán apelin gén az X kromoszóma hosszú karján található, és a 77 aminosav hosszú apelin előalakot kódolja. Számottevő a szekvencia homológia a különböző emlős fajok között, a 23 C-terminális aminosav megegyezik patkányban, egérben, szarvasmarhában és emberben (Beltowski 2006). Az apelin előalakot proteázok hasítják, hogy létrehozzák a jelentősen rövidebb, biológiailag aktív formákat,

így az apelin-36, -17, -16, -13, -12 molekulákat és az apelin-13 pyroglutamáttal módosított alakját, a Pyr1-apelin-13-at. Ez utóbbi molekula esetében a poszttranszlációs módosítást a glutaminil cikláz katalizálja, és ez ellenállóbbá teszi a peptidet az enzimatis degradációval szemben (Falcao-Pires 2010) (**2. ábra**). Mindemellett fontos megemlíteni, hogy miközben a 12 C-terminális aminosav tűnik alapvetőnek az apelin biológiai aktivitásához, az N-terminális szekvencia szabályozhatja a ligand-receptor kölcsönhatást, különösen az első 20 aminosav, amelyek fontos szerepet játszanak a HIV-1 fertőzés folyamatában is a sejt-sejt fúziónál (Zhou 2003; Zhou 2003). Az egyetlen jelenleg ismert metabolikus útvonalban egy cink-tartalmú karboxipeptidáz, az angiotenzin konvertáló enzim II hasítja az apelin-13 és az apelin-36 C-terminális aminosavát, és konvertálja azokat biológiailag inaktív peptiddé (Lee 2005). A klasszikus ACE-gátlók nem hatnak erre az enzimre. Más specifikus ACE-2 inhibitorok hatása tisztázatlan, mivel ezek az angiotenzin II-öt is konvertálják angiotenzin 1-7-re, így azok elérhetőségét is korlátozzák. Az ACE-2 főleg a szív és vese artériáiban, arterioláiban és venuláiban, a renális tubuláris epitheliumban és a herékben mutatható ki (Burrel 2004).

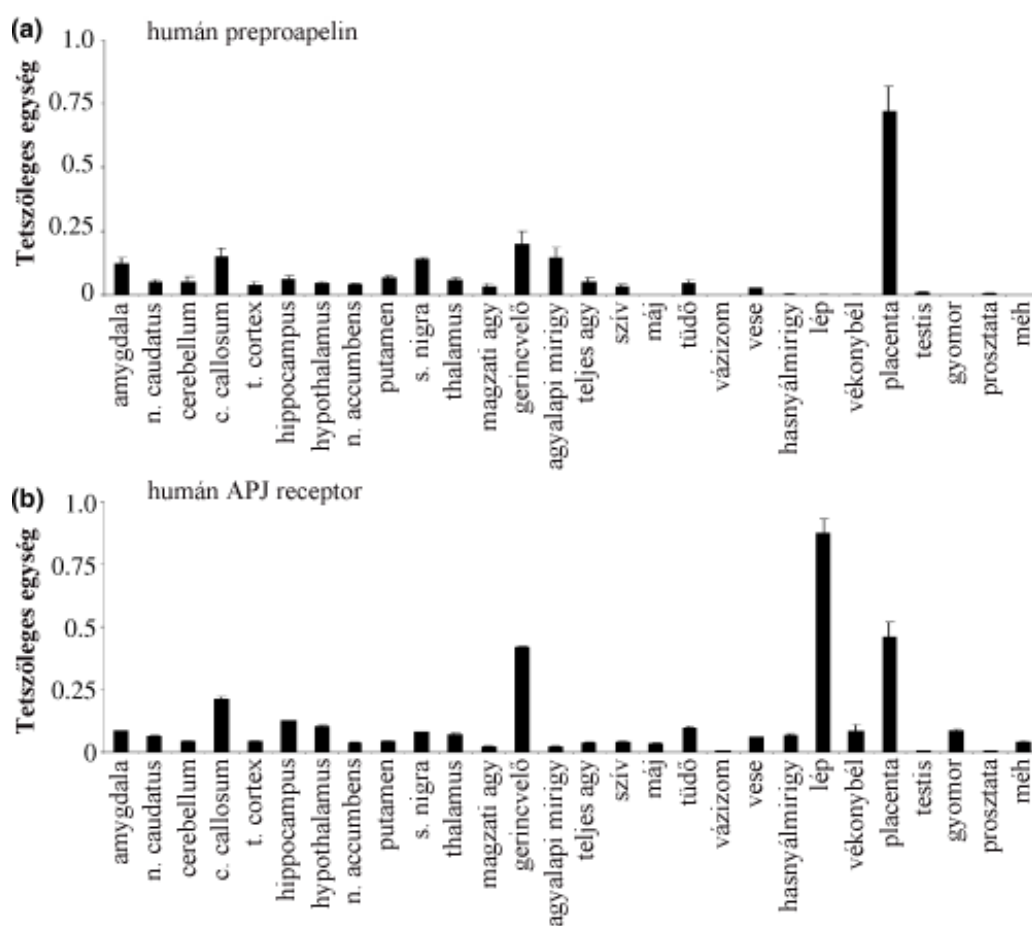


2. ábra

Az apelin peptidek szintézise és metabolizmusa. A biológiailag aktív peptidek szürkével vannak jelölve (Beltowski 2006).

Az apelin előalak és APJ receptor mRNS eloszlását a humán szövetekben a **3. ábra** mutatja. Az apelin mRNS minden központi idegrendszeri régióban és több

perifériás szövetben is kifejeződik, legnagyobb mértékben a placentában. A központi idegrendszerben leginkább a gerincvelő, a corpus callosum, az amygdala, a substantia nigra és az agyalapi mirigy esetén detektálták. A perifériás szövetek közül a szívben, tüdőben és vesében is expresszálódik az apelin előalak (Medhurst 2003). Az APJ mRNS is széleskörűen kifejeződik a humán szövetekben, így a központi idegrendszerben és bizonyos mértékig a legtöbb perifériás szövetben is. Legmagasabb expressziós szint a lépben figyelhető meg, de a placentában, a gerincvelőben és a corpus callosumban is kifejeződik a receptor. Az APJ kisebb mértékű expresszióját detektálták más központi idegrendszeri (pl. hippocampus, hypothalamus) és perifériás szövetben (tüdő, bél, gyomor) (Medhurst 2003).



3. ábra

Az apelin előalak (a) és APJ receptor (b) mRNS expressziós profilja a humán központi idegrendszerben és perifériás szövetekben (Medhurst 2003).

Ezen expressziós profil alapján láthatjuk, hogy az apelin receptor és ligandja számos központi idegrendszeri és perifériás szövet esetén együttesen is kifejeződik, ami a receptor autokrin/parakrin módon való aktivációjára utal. Az endotél sejtekben az apelin szignalizáció parakrin módon történhet (Masri 2004), ahogy a retinában is különbözik a receptor és ligandjának expressziós mintázata az egyes endotél populációkban (Saint-Geniez 2002). A központi idegrendszerben ugyanakkor a szabályozás történhet autokrin és parakrin módon is. Vagyis a helyileg szintetizált apelin aktiválhatja a szomszédos neuronok által expresszált receptorokat parakrin módon, vagy egy neuron által kibocsátott apelin molekula aktiválhatja az ugyanazon neuron által kifejezett preszinaptikus receptort autokrin szabályozással (Masri 2004). A vaszkuláris és cerebrális struktúrák mellett ugyanakkor az apelin expresszálódik az agyalapi mirigyben is (De Mota 2000), mely arra utalhat, hogy endokrin hormon. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy immunreaktív apelin jelen van a humán plazmában is, mégpedig pikomoláris koncentrációban (Földes 2003). Említésre méltó az is, hogy apelint elsőként gyomor extraktumból izolálták (Tatemoto 1998), és az apelin mRNS nagyfokú expresszióját írták le gyomor fundusban (Wang 2004). Tömegesen vannak apelin-pozitív sejtek a gyomor mirigyves állományában, ahol a szabályozás szintén endokrin módon valósulhat meg, ugyanis a gyomorsejtek némelyike enteroendokrin sejtékként funkcionál (Wang 2004). Ugyanakkor az apelin exokrin szekréciója is ismert. Terhes patkányokban az apelin legnagyobb mértékben az emlőmirigyben detektálható, és tömegesen szekretálódik a colostrumba (Habata 1999). Ugyanakkor az apelin koncentráció a plazmában alacsonyabb, mint a szövetekben, és ez a szint nem emelkedik a terhesség vagy tejelválasztás során (Kawamata 2001). Ez arra utal, hogy az apelin exokrin módon ürül az emlőmirigyből (Masri 2004).

2.2.2 Az apelinerg rendszer élettani szerepe

Mivel az apelin és receptora intenzíven expresszálódik a hypothalamus supraoptikus és paraventriculáris magjaiban (Reaux 2001), feltételezhetjük, hogy az APJ/apelin rendszer részt vesz a hypothalamus-hypophysis axis, valamint a folyadék homeosztázis szabályozásában (Ladeiras-Lopes 2008). Az ezzel kapcsolatos eredmények azonban ellentmondásosak. Egyesek szerint apelin adása patkányokban a

vízfogyasztás csökkenésével jár (Reaux 2001), mások szerint növekedésével (Taheri 2002).

2005-ben írták le, hogy egérben és emberben a zsírsejtek apelint termelnek (Boucher 2005). Hiperinzulinémiás elhízott egérben megfigyelték a plasma és az adipocyták apelin szintjének növekedését, ugyanakkor alacsony inzulin szintnél és éheztetés során csökkent a zsírsejtek által szekretált apelin mennyisége. A szekréció gyorsan helyreállt táplálék felvétel után, amiből arra következtethetünk, hogy az inzulin növeli az apelin szekréció mértékét (Ladeiras-Lopes 2008). A közelmúltban megjelent tanulmányok szerint a zsírsejtek jelenthetik a keringő apelin fő forrását (Castan-Laurell 2005).

Ahogy a korábbiakban már említettem, az apelint elsőként gyomor extraktumból izolálták (Tatemoto 1998), és a gyomor fundusban is nagymértékben expresszálódik (Wang 2004). Leírták, hogy az APJ aktiválása serkenti a gyomor és endotél sejt proliferációt, valamint a cholecystokinin szekréciót is rágcsáló enteroendokrin sejt vonal esetében (Wang 2004). Az apelinnek hatása lehet a táplálék felvételre is, bár az ezzel kapcsolatos eredmények ellentmondásosak (Taheri 2002, Sunter 2003, O'Shea 2003).

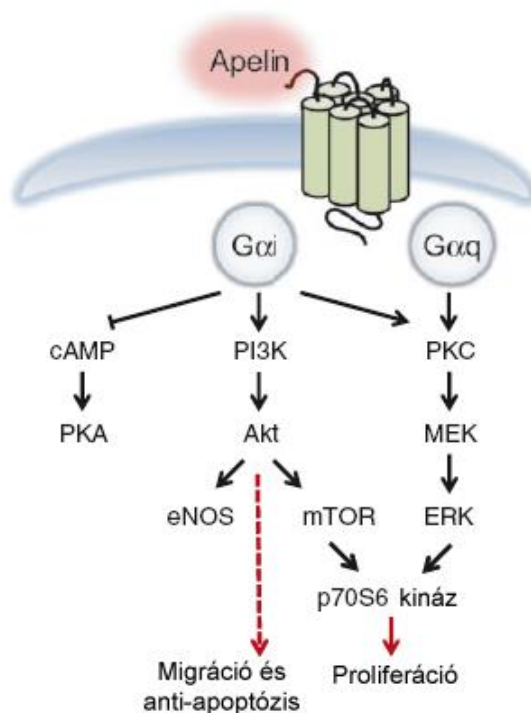
Az apelin/APJ rendszernek a fiziológiai folyamatok mellett szerepe lehet a gyulladáshoz vezető folyamatokban is, így gyulladáshoz vezető bélbetegségekben is (Han 2007). Az apelin/APJ rendszer májcirrózis esetén is aktiválódik (Falcão-Pires 2010; Principe 2008).

Patkányokban az apelin molekula intravénás adása az artériás vérnyomás csökkenéséhez vezet (Tatemoto 2001). *In vivo* tanulmányokban leírták, hogy az apelin a perifériás vénák tágításával csökkenti a vérnyomást (Cheng 2003). Az apelin hipotenzív hatása az endotélium által termelt nitrogén-monoxid közreműködésével érvényesül (Tatemoto 2001). A perifériás vér apelin szintje összefüggést mutat a szívben az apelin kifejeződésének mértékével, ez alapján feltételezhetjük, hogy a keringő apelin egy része a szívből származik (Földes 2003).

2.2.3 Az apelinerg rendszer jelátviteli útvonalai

Az apelin receptor aktivációja sejttípus-függő módon számos sejten belüli jelátviteli útvonalat szabályoz (**4. ábra**). Az apelin peptidek erőteljesen gátolják a ciklikus AMP-termelődését humán APJ receptort expresszáló kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtekben, amely arra utal, hogy az APJ G-fehérjékhez kapcsolódik (Habata 1999). Ezekben a sejtekben az apelin dózisfüggően és a Ras aktivitástól független módon serkenti az ERK molekula foszforilációját a PKC útvonalon keresztül (Masri 2002). Emellett az apelin aktiválhatja a p70S6 kinázt nemcsak az APJ receptort stabilan expresszáló CHO sejtekben, de vérér endotél sejtekben is. Ez az aktiváció összefügg a PI3K-Akt és az ERK útvonallal (Masri 2004). Továbbá más G-fehérjék közreműködéséről is beszámoltak, így például rágeszáló adipocytákban a Gq molekuláról (Yue 2011). Ezekben a sejtekben az apelin az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) aktivációját eredményezi (Attané 2011). Mindemellett, szívizomsejtekben az erőteljes apelin indukált inotropikus válasz a PLC és PKC molekulák aktivációját vonja maga után (Szokodi 2002). Azt is fontos megjegyezni, hogy az APJ receptor apelin peptidek általi aktiválódását követően internalizálódhat, ami a receptor érzéketlenné válását eredményezi (Masri 2006, Zhou 2003). Az APJ sejttípus-specifikus sejtmagi lokalizációját is leírták humán agyban és kisagyi eredetű D283 Med sejtekben, ami arra utal, hogy közreműködhet a transzkripcionális szabályozásban, hasonlóan más G-fehérje kapcsolt receptorokhoz (Lee 2004).

Az apelin serkenti az egér és a humán osteoblast sejtek proliferációját, és gátolja apoptózisukat (Tang 2007, Xie 2006). Az apelin eme proliferációt indukáló hatása a PI3K/Akt transzdukciós kaszkádon keresztül érvényesül (Xie 2006). Az apelin molekula osteoblastokra gyakorolt mitogén hatása kiindulópontul szolgálhat különböző csontbetegségek kezelésénél. Azt is leírták, hogy az apelin serkenti a porcsejtek proliferációját is, és a porc metabolizmus folyamatában katabolikus szerepet játszhat, így rizikófaktort jelenthet az osteoarthritis folyamatában (Hu 2010). Mindezek mellett az apelin-13 a csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek túlélési faktora is (Zeng 2011), valamint serkenti patkány érfali simaizomsejtek proliferációját a PI3K/Akt jelátviteli útvonalon keresztül (Liu 2010).



4. ábra

Az apelinerg rendszerhez kapcsolódó intracelluláris jelátviteli útvonalak vázlata és ennek celluláris hatásai (Kidoya 2012 Aug).

2.2.4 Az apelinerg rendszer gátlása

Az utóbbi években több APJ receptor antagonistát közöltek. A CXCR4 kemokin receptor kismolekulájú antagonistája, az ALX40-4C kötődik az apelin receptorához is, és képes blokkolni a receptor ligand indukálta internalizációját és az apelin molekula közvetítette jelátvitelt (Zhou 2003). Az F13A-ról, amely az apelin-13 C-terminális fenilalaninjének alaninre való mutációjának eredménye, leírták, hogy az APJ receptor funkcionális antagonistája. Az apelin-13 hipotenzív hatását blokkolta az F13A molekula egyidejű adása; ugyanakkor önmagában nem befolyásolta szignifikánsan a vérnyomást (Lee 2005). Apelin-13 intravénás adása szignifikánsan csökkentette a szisztolés és diasztolés vérnyomást hipertenziós patkányokban, aminek a hatását teljesen gátolta F13A adása (Soltani Hekmat 2011). Arról is beszámoltak, hogy az F13A kezelést követően az érhalózat területe 52%-kal csökkent a belfodorban portális hipertenziós patkányokban. A CD31, a PDGF, a VEGF és az angiopoietin-2 expresszió csökkent a kontroll patkányokhoz képest a belfodorban a kezelést követően. Az F13A adása gátolta

a p70S6K foszforilációt, az ERK foszforilációt ugyanakkor nem (Tiani 2009). Az eredmények azonban ellentmondásosak, ugyanis újabban arról írnak, hogy az F13A egy kompetitív agonistája az APJ receptornak (Macaluso 2011). Nemrégiben beszámoltak újabb funkcionális antagonistá molekulákról, így a cyclo(1-6)CRPRLC-KH-cyclo(9-14)CRPRLC és a 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoát (ML221) molekulákról (Macaluso 2011; Maloney 2012).

2.2.5 Az apelinerg rendszer szerepe az angiogenesis folyamatában

Az embrionális periódus alatt az APJ expresszió főleg a fejlődő szív és az elsődleges vérerek endotél sejtjeire és endoteliális prekursor sejtjeire korlátozódik (Devic 1999). Emellett lényeges a szerepe a béka embrió szabályos vaszkuláris mintázatának kialakulásában is (Cox 2006). További tanulmányok arról is írnak, hogy az apelin és receptora később is nagymértékben kifejeződik a vérerek falában, különösen az endotél sejtekben, ami arra utal, hogy az APJ/apelin jelátvitelnek szerepe lehet a vaszkuláris funkció fenntartásában vagy módosításában (Klein 2004). Azt is leírták, hogy az apelin serkenti az emberi köldökvéna endotélsejteket (Masri 2004) és az egér agy mikrovaszkuláris sejtek *in vitro* növekedését (Cox 2006). Továbbá az apelin serkenteni képes a majom retinában az endotél sejtek migrációját és kapilláriszerű érálózat formálódását (Kasai 2004). Ezzel összhangban azt is közölték, hogy serkenti az érképződést *in vivo* csirke chorioallantois membránban (Cox 2006) és egérben subcutan matrigel plug assay rendszerben (Kasai 2004).

Az apelin/APJ rendszer szerepet játszik a vérér átmérő szabályozásában is (Kidoya 2008, Takakura 2009). Az Ang1/Tie2 és a VEGF/VEGFR rendszerek hatékony szabályozói a vérerek átmérőjének. Ezzel összhangban a Tie-2 aktiváció apelin expressziót indukál a vérerekben (Takakura 2009). Valamint azt is leírták, hogy az apelin VEGF jelenlétében serkenti a HUVEC sejtek proliferációját (Kidoya 2008). Továbbá az apelin szabályozza ezen sejtek szferoid formáló képességét is (Takakura 2009). Ezt a szferoid modellt széles körben alkalmazzák sejtes differenciáció, sejt-sejt interakciók és hypoxiára adott válaszok tanulmányozására tumorokban és embrionális őssejtek esetében. Azt tapasztalták, hogy a HUVEC sejteket előkezelve VEGF-ral, és apelin jelenlétében fenntartva a szferoid tenyészetet, az apelin nagyobb méretű

szferoidokat indukált mint a VEGF önmagában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az apelin hatással lehet a sejt-sejt aggregációra (Takakura 2009). VEGF jelenlétében az apelin molekula nagyobb méretű endotélcsövek formálódását serkentette *ex vivo* aorta gyűrű kísérletben (Takakura 2009). Ugyanakkor arról is beszámoltak, hogy az apelin szignifikánsan indukálta a HUVEC sejtek claudin-5 expresszióját, amely protein a szoros kapcsolatok alkotóelemeként a paracelluláris transzport szabályozásában vesz részt (Kidoya 2008).

2.2.6 Az apelinerg rendszer szerepe daganatokban

Az apelin fokozott expressziója megfigyelhető több daganattípusban is. Glioblastoma multiforme esetében az angiogén tumor érhálózatban fokozottan expresszálódik az apelin receptor és ligandja, amely autokrin szabályozási módra utal a tumor beereződésének a folyamatában (Kälin 2007). Immunhisztokémiai tanulmányokban arról számolnak be, hogy az apelint kifejezik invazív duktális vagy lobuláris emlőkarcinóma rosszindulatú tumorsejtjei (Wang 2008). Rágcsáló emlőrák és melanóma esetén az apelin nagymértékű kifejeződése serkenti a tumorok beereződését és *in vivo* növekedését (Sorli 2006, Sorli 2007). Nemrégiben közölték, hogy szájüregi laphámrák sejtek is expresszálják az apelint, és az apelin új prognosztikus faktorként szerepelhet ezen daganattípus esetében (Heo 2012). Más tanulmányok arról írnak, hogy colon26 rágcsáló adenocarcinóma és Lewis tüdő adenocarcinóma endotél sejtjei nagymértékben kifejezik az apelin receptorát. Az utóbbi daganattípus esetén a receptor és ligandjának koexpressziója figyelhető meg a tumor vérereiben. Apelint túltermelő colon26 sejtekből fejlődő tumorokban a vérerek belső átmérője nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest. A vérerek belső átmérőjének növekedéséről írnak apelin hatására humán PC3 prosztata ráksejtekből és B16 egér melanóma sejtekből fejlődő tumorokban is (Kidoya 2012 Jul). Az apelinerg rendszer szerepét NSCLC-ben a mi munkacsoportunk vizsgálta először. Bár az apelin expresszió szabályozásának a molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert, azt már közölték, hogy a hypoxia által megnövekedett apelin expresszió (Ameri 2010) kapcsolatban áll azzal, hogy az apelin gén első intronján belül elhelyezkedő hypoxia-érzékeny elemhez (HRE) kötődik a HIF-1 molekula (Eyries 2008).

2.2.7 Az apelinerg rendszer szerepe a nyirokérképződés folyamatában

Nemrégiben írták le, hogy az APJ-t kifejezik a humán nyirokendothél sejtek is, és az apelin indukálja ezeknek a sejteknek az *in vitro* érhalózat képzését, migrációját, valamint stabilizálja azokat permeabilitási esszében. Exogén apelin kezelés serkentette az Akt foszforilációját ezekben a sejtekben. *In vivo* az apelin/APJ rendszer aktiválása gátolta az UVB-indukált gyulladást a nyirokerek és vérerek abnormális növekedésének gátlásával. Vagyis az eredmények arra utalnak, hogy az apelin szerepet játszhat a nyirokerek stabilizálásában gyulladással szövetekben (Sawane 2011). További *in vitro* és *in vivo* kísérleti modellek szükségesek azonban az apelin pontos szerepének tisztázásához mind a fiziológiás, mind a patológiás nyirokér növekedésben.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban egyrészt az apelinerg rendszer szerepére kerestük a választ az NSCLC angiogenezisében, valamint a nyirokérképződés folyamatában, másrészt az mTOR gátlás hatását vizsgáltuk temsirolimus által MPM esetén; amelyek alapján ezek a molekulák mint lehetséges célpontok szerepelhetnek majd terápiás alkalmazásban.

1. Az apelin és az APJ receptor expressziójának vizsgálata NSCLC-ben. Az apelin kifejeződését NSCLC sejtvonalakon és humán tumor mintákon vizsgáltuk mRNA szinten kvantitatív PCR-rel, fehérje szinten immunhisztokémiával illetve immunfluoreszcens jelöléssel, valamint ELISA-val.

2. Apelin hatásának vizsgálata az NSCLC-re *in vitro*. Exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatását vizsgáltuk az NSCLC sejtvonalak proliferációjára *in vitro*.

3. Fokozott apelin expresszió hatása NSCLC-re *in vivo*. Apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatását néztük az NSCLC tumorok növekedésére, érdenzitására és mikroér-kerületére *in vivo*.

4. Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlító/átfogó vizsgálata.

5. APJ receptor kifejeződésének vizsgálata humán nyirok endotél sejtvonalon: mRNA szinten kvantitatív PCR-rel, fehérje szinten immunhisztokémiával.

6. Apelin hatásának vizsgálata a humán nyirok endotél sejtekre *in vitro*. Exogén apelin és módosított apelin-származékok hatását vizsgáltuk a humán nyirok endotél sejtek proliferációjára, sferoid képződésére, migrációjára, érhalózat formálódására és apoptózisára, valamint western blottal tanulmányoztuk, hogy milyen -az APJ jelátviteli útvonalba eső- molekulákat aktivál az apelin kezelés.

7. Mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitásának jellemzése és az mTOR gátlás hatása a szferoidképzésre. Letapadásmentes közegben, szérumentes tápfolyadékban vizsgáltuk humán mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitását, valamint temsirolimus kezelést követően számoltuk az MPM szferoidok számát és átmérőjét.

4 MÓDSZEREK

4.1 Beteganyag

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 94 beteget választottunk ki, akiket NSCLC-vel kezeltek 1997 januárja és 2001 decembere között. Közülük 68 férfi- és 26 nőbeteg volt, a medián életkoruk 63 év volt (tartomány: 44-81 év; **1. táblázat**). A formalin-fixált, paraffinba ágyazott NSCLC minták az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Patológiai Osztályáról származtak, az Etikai Bizottság jóváhagyásával és az Orvosok Világszövetségének Helsink Deklarációjában megfogalmazott etikai irányelvek figyelembe vételével. A szövettani diagnózist és az N-stádiumot hematoxylin és eozin-jelölt mintákon határoztuk meg. Ez alapján 35 laphámrákot, 54 adenokarcinómát és 5 nagysejtes tüdőrákot különítettünk el. A mintákból tumormentes tüdőszövetet is eltávolítottunk. A stádiumokat az American Joint Committee on Cancer TNM klasszifikációja alapján határoztuk meg a műtéti és patológiai leletek alapján (Mountain 1997).

A molekuláris vizsgálatokhoz (polimeráz láncreakció) 46 NSCLC-vel kezelt beteg sebészi úton frissen eltávolított tumoros és normál tüdőszövetét használtuk. A tumoros mintákhoz közvetlenül a sebészi eltávolítás után hozzájutottunk, és félbevágtuk. A minták egyik felét paraffinba ágyasztuk, előkészítve azokat a rutin szövettani vizsgálatokhoz, valamint az apelin pozitív tumorsejtek százalékanak immunhisztokémiai jelöléssel való meghatározásához. A minták másik felét folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és -80°C -on tároltuk az mRNS izolálásáig (ETT TUKEB engedélyszám: 153/PI/10; 2521-0/2010-1018EKU).

Minden tumoros és normál tüdőszövet sebészi úton lett eltávolítva, és a tanulmányba bevett betegek közül egyiket sem kezeltek neoadjuváns terápiával.

1. táblázat

A klinikopatológiai tulajdonságok és az apelin expressziója közötti korreláció NSCLC-vel kezelt betegek esetén (n=94).

	Betegszám (%)	Apelin expresszió		P érték
		Alacsony (%)	Magas (%)	
Betegek	94 (100%)	30 (31.91%)	64 (68.09%)	
Kor (évek)^a				
63<	45 (47.87%)	11 (36.67%)	34 (53.13%)	
63≥	49 (52.13 %)	19 (63.33%)	30 (46.87%)	0.14
Dohányzás				
Nemdohányzó	21 (22.34%)	7 (23.33%)	14 (21.88%)	
Dohányzó v. ex-dohányos	73 (77.66%)	23 (76.67%)	50 (78.12%)	0.87
Nem				
Férfi	68 (72.34%)	21 (70%)	47 (73.44%)	
Nő	26 (27.66%)	9 (30%)	17 (26.56%)	0.73
N stádium				
N0	35 (37.23%)	12 (40%)	23 (35.94%)	0.94
N1	30 (31.92%)	10 (33.33%)	20 (31.25%)	0.63
N2	29 (30.85%)	8 (26.67%)	21 (32.81%)	0.56
T stádium				
T1	37 (39.36%)	13 (43.33%)	24 (37.5%)	0.36
T2	32 (34.04%)	8 (26.67%)	24 (37.5%)	0.37
T3	25 (26.6%)	9 (30%)	16 (25%)	0.94
Szövettan				
AC	54 (57.45%)	18 (60%)	36 (56.25%)	0.64
SCC	35 (37.23%)	10 (33.33%)	25 (39.06%)	0.6
LCC	5 (5.32%)	2 (6.67%)	3 (4.69%)	0.76
MVD^b				
Alacsony	51 (54.26%)	21 (70%)	30 (46.87%)	
Magas	43 (45.74%)	9 (30%)	34 (53.13%)	0.04

^a A cutoff érték medián értéket jelöl.

^b A cutoff érték átlag értéket jelöl. A zárójelben levő adatok az oszlopok százalékos arányát mutatják.

4.2 Sejtvonalak

Az NSCLC sejtvonalak közül a H358, a H1650, a H1975 és HTB182 vonalak az American Type Culture Collection-től (Virginia, USA); az LCLC-I03H és HCC-15 vonalak a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures-től (Braunschweig, Németország) származtak. Az LC42, az EKVX és a SELS vonalakat Prof. Oystein Fodstad, az oslói Rákkutató Intézet professzora bocsátotta rendelkezésünkre. A sejtvonalakat 37⁰C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, RPMI 1640 tápfolyadékban (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) tartottuk fenn, ami 10% főtális borjúsavót (FCS; Sigma Chemical Co.) és 1% penicillin/streptomycint (Sigma Chemical Co.) tartalmazott.

A nyirok endotél sejteket a Bécsi Orvostudományi Egyetemen, Dr. Marion Gröger laboratóriumában izolálták. A sejtek fitymabőr eredetűek voltak. Az izolálás úgy történt, hogy a fitymabőrt diszpázzal (Invitrogen Life Technologies, California, USA) kezelték 20 percig 37⁰C-on, majd mechanikailag eltávolították az endotélsejteket sejtkaparóval. A sejteket fibronektinnel fedett tenyésztő edénybe tették ki, és endotélsejt médiumban növesztették (EGM-2 MV kit; Lonza, Walkersville, USA). Az első passzáznál a nyirok endotél sejteket mágneses szeparálással, anti-podoplanin szérummal szelektálták (Gröger 2004).

A humán mesothelioma sejtvonalakat a Bécsi Orvostudományi Egyetem bocsátotta rendelkezésünkre. A ciszplatin rezisztens P31res1.2 alvonalat 1.2 mg/L végkoncentrációjú *in vitro* ciszplatin kezeléssel szelektáltuk a szülői P31 vonalból. Az MPM sejtvonalakat 10% FCS-tartalmú RPMI 1640 vagy DMEM tápfolyadékban tartottuk fenn.

4.3 Stabil transzfektáns sejtvonalak létrehozása

A humán apelin komplementer DNS-t az OriGene-től rendeltük (Rockville, USA). A kódoló régiót a következő primerekkel amplifikáltuk: 5'-CGC GAA TTC GGC ATG AAT CTG CGG CTC TG-3' és 5'-GCG CTC GAG TCA GAA AGG CAT GGG TCC-3' (**2. táblázat**). A PCR termékeket *EcoRI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel (Invitrogen) szubklónoztuk a pcDNA 3.1 vektorba. Az expressziós vektor nukleotid

szekvenciáját DNS szekvenálással erősítettük meg. A H358 és H1975 sejtvonalakat transzfektáltuk a kontroll illetve apelin-kódoló pcDNA 3.1 vektorokkal a FuGENE 6 transzfekeiós reagenssel (Roche Diagnostic, Mannheim, Németország), a gyártó leírásának megfelelően. A stabil transzfekeiánsokat geneticin rezisztenciájuk alapján szelektáltuk (400 µg/ml; Gibco, Paisley, UK).

4.4 Hatóanyagok, gyógyszerek

In vitro kísérleteinkben az apelin-13 (Phoenix Pharmaceuticals, California, USA), az apelin-36 (Phoenix Pharmaceuticals), és egy módosított apelin-származék, az F13A (Phoenix Pharmaceuticals) hatását vizsgáltuk. A mesothelioma sejtvonalakkal végzett vizsgálatokban használt temsirolimust a Wyeth Pharmaceuticals Inc.-től (Cambridge, USA) szereztük be, amely az *in vitro* kísérletekhez 25 ng/µl koncentrációjú DMSO-ban lett oldva. A DMSO koncentrációja mindig 1 % alatt volt *in vitro*, ebben a koncentrációban ugyanis bizonyítottan még nincs hatása a sejtekre.

4.5 Antigénkimutatási módszerek

4.5.1 Immuncitokémia az apelin és receptora (APJ) expressziójának meghatározására humán NSCLC vonalakon és humán nyirok endotél sejteken

Humán NSCLC vonalakon az apelin expressziót, a humán nyirok endotél sejteken az apelin receptorának megjelenését vizsgáltuk immuncitokémiával. Ehhez 24 lyukú sejtenyésztió edényben, üveglemezre kitettünk 10⁵ sejtet. Másnap fixáltuk a sejteket 4%-os paraformaldehid oldatban. 0.01%-os Triton-oldattal permeabilizáltunk. Nyúl anti-humán apelin-36 (Phoenix Pharmaceuticals) illetve egér anti-humán APJ antitestet (R&D Systems, Minneapolis, USA) adtunk a sejtekhez 1:20-ban, és 37⁰C-on inkubáltuk egy órát. Másodlagos antitestnek biotinált anti-nyúl illetve anti-egér antitestet (Vector Laboratories, California, USA) használtunk, amelyet fluoreszcens streptavidinnel (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA) jelöltünk. A sejtmagokat propidium-jodiddal (Partec, Görlitz, Németország) festettük.

4.5.2 Sejtes apelin szekréció vizsgálata NSCLC vonalakban

A vad típusú humán NSCLC vonalak (H358, H1650, HCC15, LCLC-I03H, H1975 és A549) és a kontroll vagy apelin expressziós vektorral stabilan transzfektált H358 és H1975 sejtek tenyészetének felülúszóját 72 óra múlva eltávolítottuk. A mintákban az apelin koncentrációját a kereskedelmi forgalomban kapható apelin-36 ELISA kittel (Phoenix Pharmaceuticals) határoztuk meg a gyártó által megadott leírásnak megfelelően. Ez az ELISA 100%-os keresztreaktivitást mutat a humán apelin-36-tal, az apelin-13-mal és az apelin-12-vel. Az eredményeinket összevetettük a standard görbékkel, az alsó detektálási limit 0.08 ng/ml volt. A méréseket háromszor ismételtük.

4.5.3 Immunhisztokémia az apelin protein expresszió és a mikroér-sűrűség meghatározására humán és xenograft tumorokban

Az immunhisztokémiai jelölést 10%-os neutrális pufferolt formalinban fixált és paraffinba ágyazott humán NSCLC mintákon végeztük el. Az 5 µm-es metszeteket először deparaffináltuk, majd az endogén peroxidázokat blokkoltuk 3%-os metanolos H₂O₂-oldattal 15 percig. Ezt antigénfeltárás követte 0,1 M-os, pH 6-os citrát pufferben 800 W-os mikrohullámmal 15 percig. Ezután a metszeteket 0.1%-os avidinnal, valamint 0.01%-os biotinnal (Vector Laboratories) inkubáltuk 15-15 percet, hogy blokkoljuk az endogén avidint és biotint. A nem specifikus proteinkötések blokkolása céljából a metszeteket 0.05%-os caseinnel (Sigma Chemical Co.), 0.05% Tween-20-szal és PBS-sel inkubáltuk 30-30 percet. A következő elsődleges antitesteket használtuk: egér anti-humán CD31 (DakoCytomation, Carpinteria, USA) és nyúl anti-humán apelin-36 (Phoenix Pharmaceuticals). Másodlagos antitestként biotinált anti-egér IgG-t (Vector Laboratories) és sertés anti-nyúl IgG F(ab')₂ fragmentet (DakoCytomation) használtunk, majd streptavidin-tormaperoxidázzal (DakoCytomation) és 3-amino-9-ethylcarbazollal (DakoCytomation) detektáltunk. A magfestés hematoxylinnal történt.

Az apelinrel jelölt minták esetében az apelin expressziójának mértékére a tumoros régióban a pozitív NSCLC sejtek hányadából következtettünk. A pozitív tumorsejtek százaléka alapján osztályoztuk a metszeteket a pozitivitás szempontjából a

következésképpen: (-) pozitív tumorsejtek nincsenek, (1+) 1-10% a pozitív sejtek aránya, (2+) 10-50% pozitív sejt, (3+) több mint 50% pozitív sejt. A metszeteket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal vizsgáltuk, fotókat SPOT digitális kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) készítettünk.

A mikroerek sűrűségének és területének meghatározásához a vérereket egér anti-humán CD31 (DakoCytomation) antitesttel jelöltük a humán minták esetében, az egér tumorokban patkány anti-egér CD31 (Pharmingen) antitesttel. A másodlagos antitest biotinált anti-egér illetve anti-patkány antitest (Vector Laboratories) volt, amelyet fluoreszcens streptavidinnel (Jackson ImmunoResearch) jelöltünk. Tumoronként három-három területet értékeltünk a CUE-2 komputerezált képanalizáló rendszerrel (ami egy speciális szoftvert, digitális kamerát és video monitort tartalmaz; Olympus, Tokyo, Japán), ahogyan azt már korábban leírtuk (Tóvári 2005, Paku 2005).

4.5.4 Apelin és receptora expressziójának kimutatása reverz transzkripció PCR-rel

Humán NSCLC vonalak 2D-s és 3D-s tenyészeiből és nyirok endotél sejtekből Trizol reagenssel (Invitrogen); a 46 NSCLC beteg frissen fagyasztott tumoros és normál tüdőszövetéből Qiagen RNeasy Mini kittel (Qiagen, Maryland, USA) izoláltuk az össz-RNS-t. A maradék DNS-tartalmat RNase-free DNase kittel (Applied Biosystems, California, USA) távolítottuk el a gyártó leírásának megfelelően. Az össz-RNS 3-3 mikrogrammjából reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk az alábbi reakcióeleggyel: deoxy-NTP (0.5 mM), random primer és oligo-dT keveréke (3 μ M végkoncentráció) (Applied Biosystems), RNasin ribonukleáz-inhibitor (20U/reakció; Promega, Wisconsin, USA), reverz transzkripció puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂ és 50 mM ditiotritol), M-MLV reverz transzkriptáz (Sigma-Aldrich, 200U/reakció) és DEPC-kezelt víz. Az átírás eredményét és az RNS-minták tisztaságát β -aktin amplifikálásával ellenőriztük (primerek: sense, 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' és antisense, 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3').

Kvalitatív PCR-t apelinre (sense, 5'-CTG CTC TGG CTC TCC TTG AC-3' és antisense, 5'-GAA TTT CCT CCG ACC TCC CTG-3') és β -aktinra készítettünk. Az

amplifikálást AmpliTaq Gold kittel (Applied Biosystems) végeztük el. A PCR reakció 42 ciklusból állt a következő hőmérsékletekkel: 1 percig 94⁰C, 1 percig 55⁰C és 2 percig 72⁰C. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen szeparáltuk gélelektroforézissel, és ethidium-bromidos festést követően GelDoc 2000 (Bio-Rad, California, USA) rendszerrel detektáltuk. Az azonosításhoz a gélből visszaizoláltuk a terméket MEGA-spin Agarose Gel Extraction kittel (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Koreai Köztársaság), és szekvenáltattuk ABI-PRISM 310 DNS szekvenálóval (AME Bioscience, Bedfordshire, Egyesült Királyság) a Laborigo-nál (Budapest, Magyarország). A PCR reakciók során alkalmazott primerek szekvenciáját a **2. táblázat** mutatja.

A kvantitatív valós idejű PCR reakciót Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System készüléken futtattuk meg. Ehhez a reverz transzkripcióval átírt cDNS mintákat használtuk, TaqMan Universal PCR Master mixszel (Applied Biosystems) és Taqman apelin (Hs00175572_m1) illetve APJ (Hs00270873_s1) génexpressziós esszével (Applied Biosystems) megsokszorozva az apelin, illetve receptora génjét. A reakciót a következő programmal futtattuk: 50⁰C (2 perc), 40 ciklusban 95⁰C (10 mp) és 60⁰C (1 perc). A real-time PCR analízis standardizálásának alapja, hogy a megsokszorozódott géneket a β -aktin háztartási génhez viszonyítjuk. A génexpresszió induló mértékét a mintában úgy határoztuk meg, hogy összehasonlítottuk az ismeretlent az ismert koncentrációjú DNS minta hígítási sorából származó standard görbével, és normalizáltuk a saját β -aktin expressziójához.

2. táblázat

A kísérleteink során alkalmazott primer-párok szekvenciája.

apelin (transzfekcióhoz)	5'-CGC GAA TTC GGC ATG AAT CTG CGG CTC TG-3' 5'-GCG CTC GAG TCA GAA AGG CAT GGG TCC-3'
apelin (kvalitatív PCR-hez)	5'-CTG CTC TGG CTC TCC TTG AC-3' 5'-GAA TTT CCT CCG ACC TCC CTG-3'
β -aktin	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'

4.6 In vitro tesztek

4.6.1 Sejtproliferációs teszt

Az NSCLC vonalak esetében 10^4 sejtet tettünk ki lyukanként 96-lyukú szövettenyésztő edényekbe RPMI/FCS-ben, majd 24 óra elteltével szérumban jelenlétében vagy anélkül kezeltük őket apelin-36-tal (Phoenix Pharmaceuticals) a következő koncentrációkban: 0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M. A sejteket 72 órán át inkubáltuk, majd kolorimetriásan meghatároztuk a relatív sejtdenzitást. Lyukanként 0,5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-ot (Sigma-Aldrich Co.) adtunk a sejtekhez, amelyet 4 óra elteltével, 37°C -on történő inkubálást követően óvatosan leöntöttünk, és az élő sejtekben keletkezett formazán-kristályokat DMSO-ban oldottuk. 570 nm-en mértük az abszorbanciát ELISA Microplate Readerrel (Bio-Rad). A kísérleteket háromszor ismételtük.

A humán nyirok endotél sejtek proliferációját BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) analízissel vizsgáltuk. 4×10^3 sejtet tettünk ki lyukanként 96-lyukú edénybe, és kezeltük apelin-13 illetve F13A (Phoenix Pharmaceuticals) különböző koncentrációival (0.5×10^{-9} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M). A sejtekhez 2 mg/ml BrdU-t (Sigma-Aldrich) adtunk, és 2 órát inkubáltuk 37°C -on. Ezt követően lecseréltük a tápfolyadékot, és 2 óra elteltével fixáltuk a sejteket 4%-os paraformaldehid oldatban. 0.01%-os Triton-oldattal

permeabilizáltunk, majd desztillált vízzel 1:6-ban hígított sósavban inkubáltuk a sejteket 10 percig. Az anti-BrdU antitestet (Becton Dickinson, New Jersey, USA) 1:20-ban adtuk a sejtekhez, és 37 °C-on inkubáltuk egy órát. Másodlagos antitestnek biotinált anti-egér antitestet (Vector Laboratories) alkalmaztunk, amelyet fluoreszcens streptavidinnel (Jackson Immunoresearch) jelöltünk. A sejtmagokat propidium-jodiddal (Partec) festettük. Mindegyik lyuk esetén 3-3 random területről készítettünk képet, és számoltuk a BrdU-pozitív sejtek százalékát ImageJ szoftverrel.

4.6.2 Sferoid növekedési assay

Vizsgáltuk az exogén apelin hatását a nyirok endotél sejtek sferoid képzésére. Sferoidról akkor beszélünk, ha a sejtek egyértelmű határozott szerkezetű, gömbszerű képződményt alkotnak. Ehhez 3×10^4 nyirok endotél sejtet ültettünk ki 24 lyukú edénybe (ultra low attachment plate; Corning Incorporated) DMEM/Ham's F-12 médiumban (PAA Laboratories, Pasching, Ausztria), kiegészítve 20 ng/ml bFGF-fel (Eubio, Wien, Ausztria), 20 ng/ml EGF-fel (Sigma-Aldrich) és 2% B27-tel (PAA Laboratories). Apelin-13-at adtunk hozzá 10^{-6} M illetve 10^{-8} M koncentrációban. 96 óra elteltével mindegyik lyukról fotókat készítettünk. Csak a 100 µm-nél nagyobb átmérőjű sferoidokat vettük be az analízisbe, és mértük az átmérőjüket az ImageJ szoftvert alkalmazva.

A humám mesothelioma sejtvonalak sferoidképző kapacitásának jellemzésére 5×10^3 MPM sejtet ültettünk ki 24 lyukú sejtenyészti edénybe (ultra low attachment plate, Corning Incorporated) DMEM/Ham's F-12 médiumban (PAA Laboratories), kiegészítve 20 ng/ml bFGF-fel (Eubio), 20 ng/ml EGF-fel (Sigma) és 2% B27-tel (PAA Laboratories). 24, 96, 168 és 240 óránál fotókat készítettünk a lyukakról. Az mTOR gátlás vizsgálatakor a temsirolimust (Wyeth Pharmaceuticals Inc.) 100 ng/ml koncentrációban adtuk hozzá a sejtekhez. 96 óra elteltével mindegyik lyukról fotókat készítettünk. Csak a 100 µm-nél nagyobb átmérőjű sferoidokat vettük be az analízisbe, és mértük az átmérőjüket az ImageJ szoftvert alkalmazva.

4.6.3 Migrációs teszt humán nyirok endotél sejtekkel

A humán nyirok endotél sejtek mozgáskéességének apelinra adott válaszreakcióit videómikroszkópos méréssel tanulmányoztuk, ahogyan azt már korábban leírtuk (Hegedűs 2000; Hegedűs 2004). 24 lyukú sejttenyésztő edénybe (Corning Incorporated, New York, USA) tettük ki a nyirok endotél sejteket szérumentes EBM-2 médiumban. A sejtek kitapadását követően a médiumot CO₂-független tápfolyadékra (Gibco) cseréltük, és apelin-13-at, F13A-t illetve apelin-36-ot adtunk hozzá 10⁻⁶ M-os koncentrációban. A sejteket olyan inkubátorban tartottuk, ami egy inverz fáziskontraszt mikroszkóp (World Precision Instruments, Florida, USA) köré lett kialakítva 37 °C-os hőmérséklettel és szobai atmoszférával. 3-3 szomszédos területről készítettünk fotókat minden 5 percben egy napig a kezelés előtt és 2 napig a kezelést követően. Egy sejt követő programmal elemeztük ki a képeket, ami az egyes sejtek pozíciójának paramétereit adatfájlokká alakítja. A vizsgált paraméter az a migrációs távolság, amelyet mindegyik sejtél a kezelés utáni első 24 órás időtartam alatti elmozdulás átlagolásával nyerünk két független kísérlet és 3-3 mikroszkópos terület alapján.

4.6.4 Endotél cső esszé humán nyirok endotél sejtekkel

24 lyukú sejttenyésztő edénybe 0,289 ml, 10 mg/ml koncentrációjú matrigelt (Matrigel Basement Membrane Matrix; BD Biosciences, California, USA) csepegtettünk lyukanként, és 37 °C-on inkubáltuk fél órát. Ezt követően szérumentes, növekedési faktort nem tartalmazó EBM-2 médiumban 100.000 sejtet tettünk ki lyukanként. A sejteket 10⁻⁶M apelin-13-mal, F13A-val illetve 20 ng/ml koncentrációjú FGF-el kezeltük. 16-18 órát inkubáltunk 37 °C-on. Ezt követően fotókat készítettünk a lyukakról, és ImageJ szoftverrel értékeltük ki a képződő csövek hosszát.

4.6.5 Apoptózis indukció a humán nyirok endotél sejteken

24 lyukú sejtenyésztő edényben, kerek üveglapra kitettünk 50.000 sejtet/lyuk. Másnap kezeltük a sejteket 10^{-6} M apelin-13-mal, illetve apoptózist indukáltunk UV-fénnyel, $200\text{mW}/\text{cm}^2$ besugárzással kb. 10 másodpercig. Ezt követően 48 órát vártunk, majd fixáltuk a sejteket 4%-os paraformaldehidben 10 percig. 0,1%-os Tritonnal permeabilizáltunk 1 percig, és fluoreszcens "in situ cell death detection kit"-tel (Roche, Mannheim, Németország) kezeltük a sejteket a gyártó leírásának megfelelően. A kit az ún. TUNEL-reakció alapján detektálja az apoptotizáló sejteket, vagyis az apoptózis során fragmentálódó DNS szabad végeihez terminális deoxinukleotidil transzferáz közreműködésével közvetlenül jelölt dUTP-t kapcsol hozzá. Az üveglapokra DAPI fedőfolyadékot cseppentettünk (Vectashield mounting médium for fluorescence with DAPI; Vector). Konfokális mikroszkóppal 10x-es nagyításon készítettünk képeket metszetenként 5-5 látótérrel.

4.6.6 Western blot vizsgálat humán nyirok endotél sejtekkel

A 10^{-6} M-os apelin-13-mal kezelt nyirok endotél sejteket lizáltuk, centrifugáltuk és denaturáltuk. 8-18%-os nátrium-dodecyl szulfát (SDS)-polyacrylamid gélelektroforézist végeztünk a mintákkal. A proteineket átvittük nitrocellulóz membránra és immundetektáltuk Akt-pAkt, Erk1/2-pErk1/2 és S6-pS6 ellenes antitestekkel (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA). A reakciótermékeket kemilumineszcens technikával detektáltuk.

4.7 *In vivo* vizsgálatok

4.7.1 Xenograft tumorok

Az apelin kifejező, transzfektált NSCLC sejtek növekedését xenograft tumorokban összevetettük a kontroll vektort expresszáló sejtek növekedésével 6 hetes nőstény athymias nude egerekben, amelyek a Charles River Laboratóriumból (Massachusetts, USA) származtak. Az intézményi állatjóléti szabályoknak megfelelően

az egereket 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk patogénmentes körülmények között mikroizolátor ketrecekben (engedélyszám: 22.1/1268/3/2010). Az apelin stabilan expresszáló illetve a kontroll vektorral transzfektált H358 és H1975 sejteket 80%-os konfluenciánál tripszinizáltuk, majd kétszer mostuk. Tízmillió sejtet oltottunk be egerenként Matrigelben (Collaborative Research Biochemicals, Massachusetts, USA) szubkután, így hozva létre a xenograftokat. A tumorok méretét 4 naponta mértük egy kaliperrel, és mm³-ben fejeztük ki az alábbi képlet alapján: hosszúság x szélesség² $\pi/6$. A tumorokat 32 nappal a beoltás után eltávolítottuk, és frissen fagyasztottuk folyékony nitrogénben a további vizsgálatok számára.

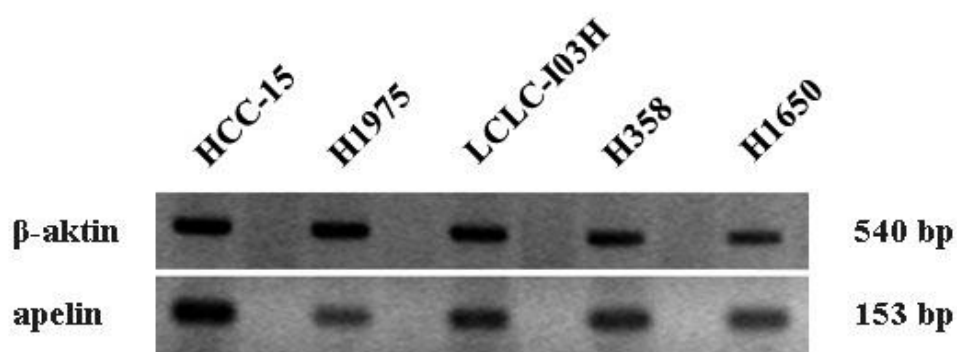
4.8 Statisztikai módszerek

A folyamatos változókat Student-t próbával hasonlítottuk össze normál eloszlású minták esetében, vagy Mann-Whitney U teszttel, ha a minták eloszlása asszimmetrikus volt. A kategorikus adatokat Fisher exact teszttel és Chi-négyzet próbával elemeztük. Spearman-féle rangkorrelációs tesztet használtunk az apelin protein és mRNS expresszió közti korreláció kimutatására. A teljes túlélési analízist Kaplan-Meier módszerrel készítettük el. A különböző túlélési függvényeket log-rank statisztikával vetettük össze. A prognosztikus faktorok multivariációs analízisét Cox regressziós modell használatával végeztük el. Az eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0.05$. A statisztikai analízisek elvégzéséhez a Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA) szoftver programot használtuk.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Apelin mRNS és protein expresszió vizsgálata humán NSCLC sejtvonalakban

RT-PCR-rel vizsgáltuk, hogy NSCLC vonalaink kifejezik-e mRNS szinten az apelin peptidet. A termékeket megfuttatva látható, hogy az apelin expresszálódik mind az öt vizsgált NSCLC vonalban, vagyis az RT-PCR igazolta az apelin jelenlétét mRNS szinten a vizsgált humán NSCLC vonalokban (**5. ábra**).

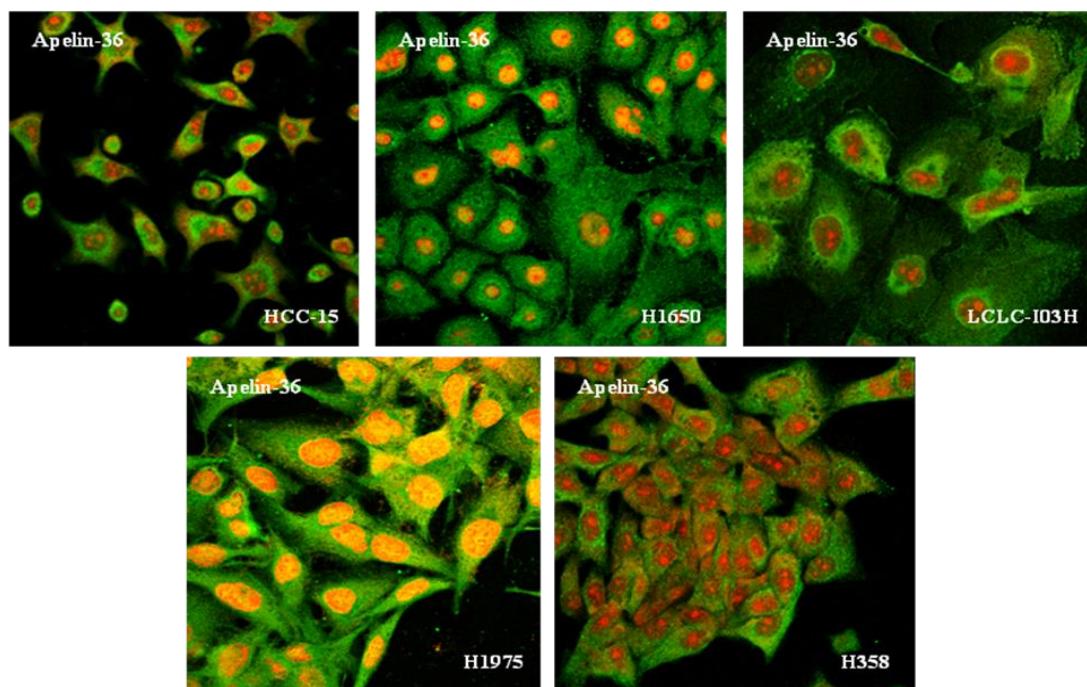


5. ábra

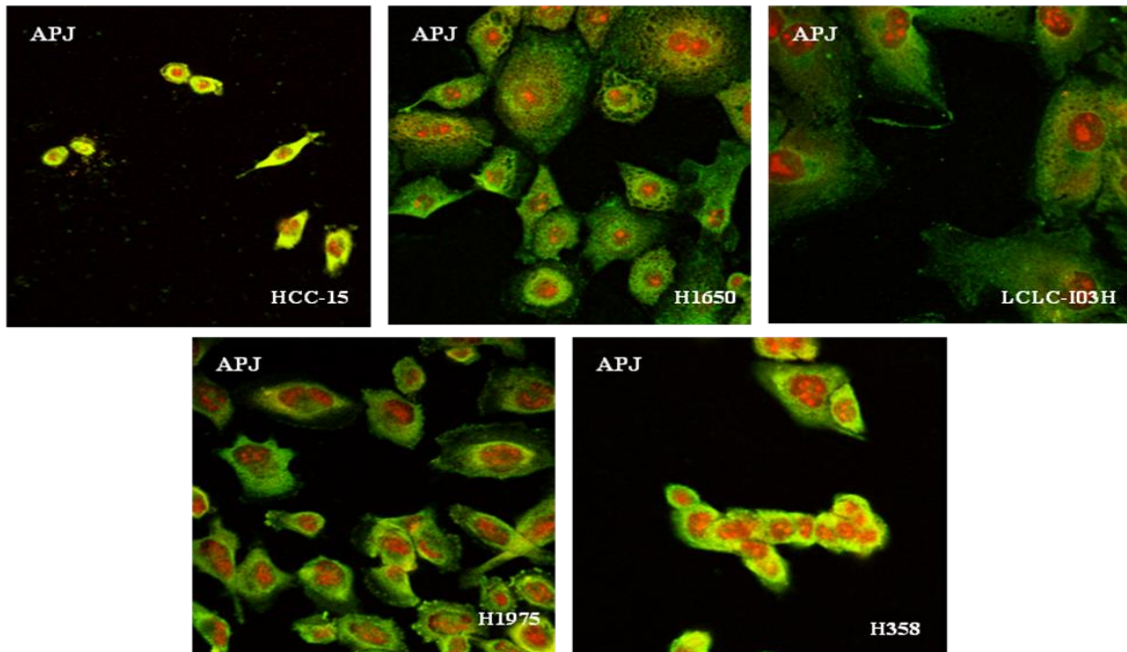
RT-PCR az apelin mRNS kimutatására humán NSCLC sejtvonalakban (β -aktin a kontroll).

A következőkben protein szinten vizsgáltuk a humán NSCLC sejtvonalakban az apelin illetve az APJ receptor kifejeződését, immuncitokémiával, fluoreszcens jelöléssel. Minden sejtvonal esetében a citoplazmában tapasztaltunk pozitív immunreakciót mind az apelin, mind a receptora esetében. A sejtmag negatív volt (6. ábra).

A



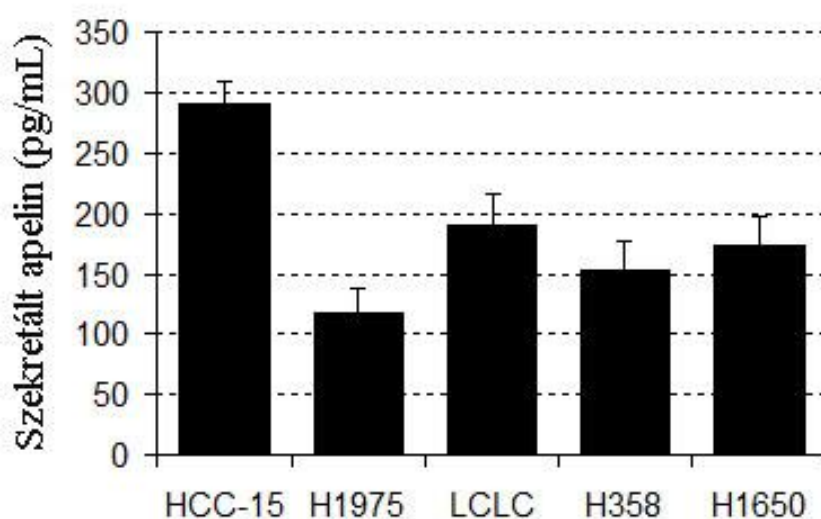
B



6. ábra

Humán NSCLC sejtvonalak jelölése immuncitokémiával apelin-36 (A) illetve APJ (B) antitesttel fluoreszcensen (zöld). A pozitív immunreakciót a citoplazmában látjuk. A sejtmagokat propidium-jodiddal festettük (piros).

A továbbiakban ELISA-val határoztuk meg, hogy milyen mértékben szekretálják a vizsgált sejtvonalak az apelint a sejttenyésztő médiumukba. Az eredmények azt mutatják, hogy a sejtvonalak mindegyike szekretálta az apelin proteint, a mért érték: 100-300 pg/mL tartományon belül volt minden vonal esetében. (7. ábra).

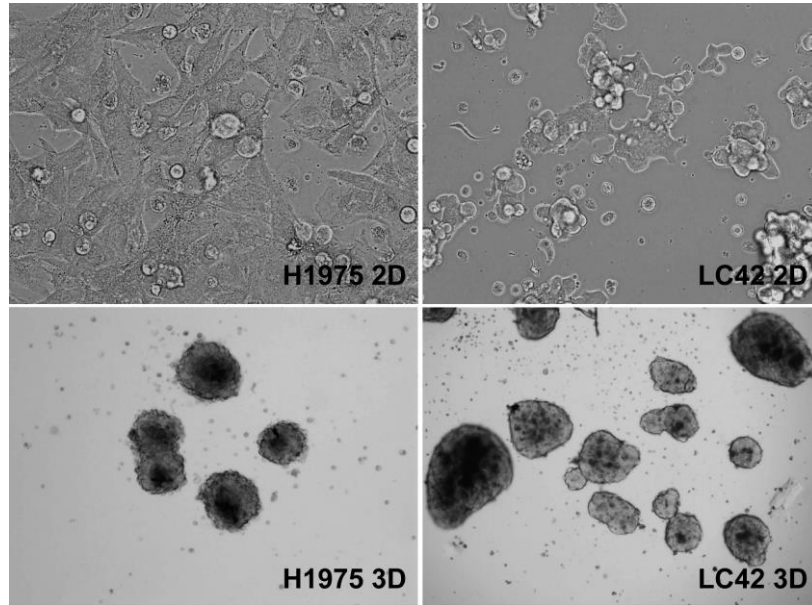


7. ábra

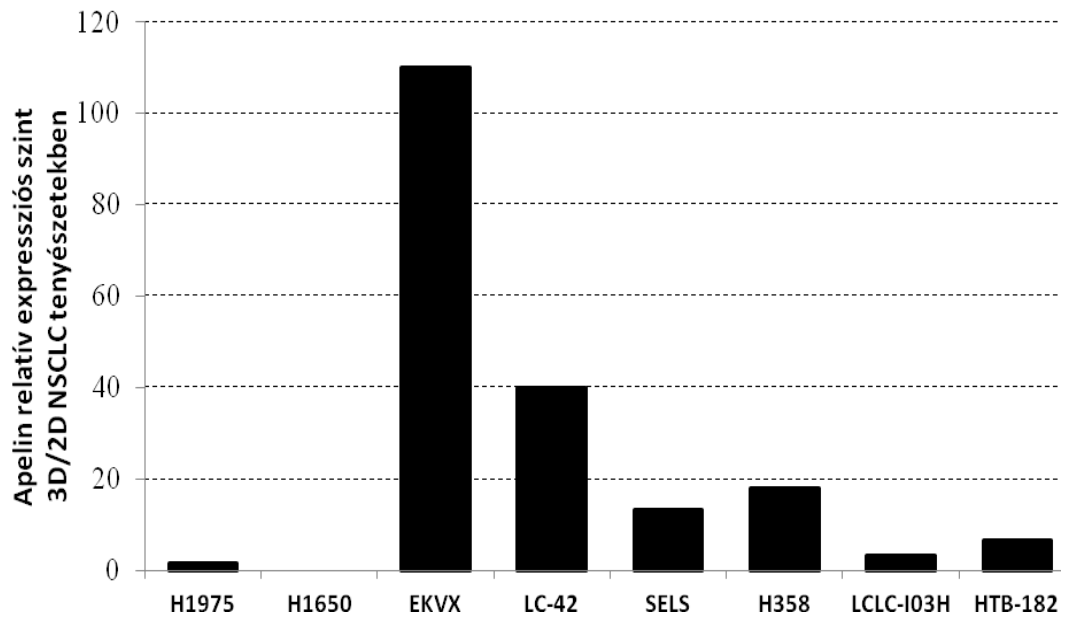
ELISA a szekretált apelin detektálására NSCLC sejtenyészetek kondicionált médiumában. Mindegyik sejtvonal szekretálta az apelint. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD.

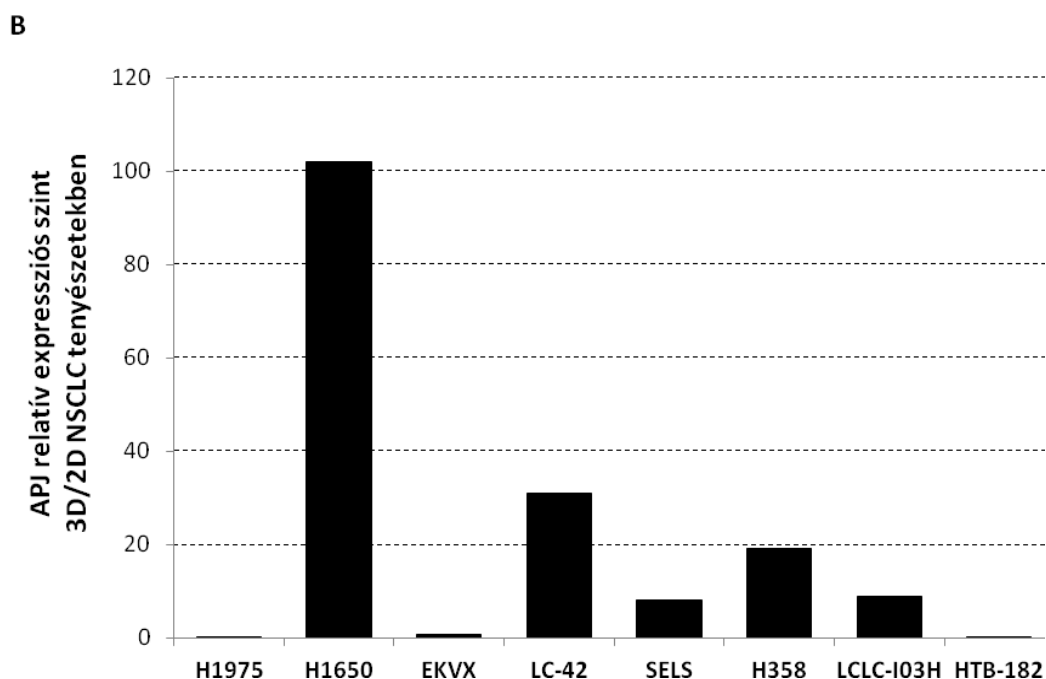
5.2 Az apelin és APJ expresszió összehasonlítása NSCLC vonalak 2D-s és 3D-s tenyészetekben

A következőkben a Bécsi Orvostudományi Egyetemen rendelkezésünkre álló 8 NSCLC vonalat (ezek nincsenek teljes átfedésben az előzőekben vizsgált 5 vonallal) tenyésztettünk letapadásmentes, szérumentes közegben, hogy 3-dimenziós szferoidokat képezzünk belőlük. Mint már említettem, a szferoidok egyértelmű határozott szerkezetű, gömbszerű képződmények. A 8 sejtvonal közül a H1975 és LC42 vonalak 2D-s és 3D-s tenyészetéről készült reprezentatív fotókat a **8.ábra** mutat. A 8 sejtvonal 2D-s és 3D-s tenyészetében vetettük össze az apelin illetve APJ relatív expressziós szintjét kvantitatív valós idejű PCR-rel. Az apelin esetében a 8 vonalból 7-nél a 3D-s tenyészetben mért apelin relatív expressziós szint többszöröse volt a 2D-s tenyészetekben mért szinteknek. Az APJ esetében ezt 8 vonalból 5-nél tapasztaltuk (**8.ábra**). Vagyis a letapadásmentes közegben képződő 3D-s struktúrák kedveztek az apelin és APJ relatív expressziós szintjének.



A



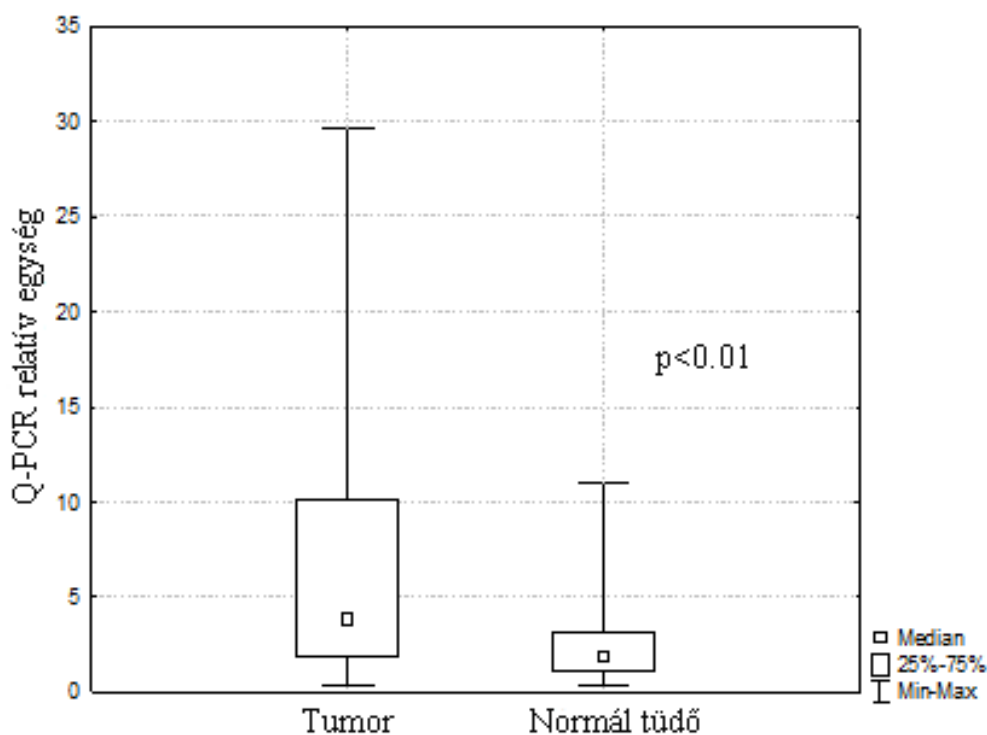


8. ábra

NSCLC sejtvonalak 2-dimenziós és 3-dimenziós tenyészeinek összehasonlítása. A felső négy képen a H1975 és LC42 sejtvonal 2D-s és 3D-s tenyészeiről készült fotók láthatóak. Alatta az oszlopdiagrammok a kvantitatív RT-PCR eredményeit mutatják az apelin (A) illetve APJ (B) relatív expressziós szintek meghatározására NSCLC sejtvonalak 3D/2D tenyszeiben.

5.3 Apelin mRNA és protein expresszió vizsgálata NSCLC betegek tumoros és normál tüdőszövet mintáiban

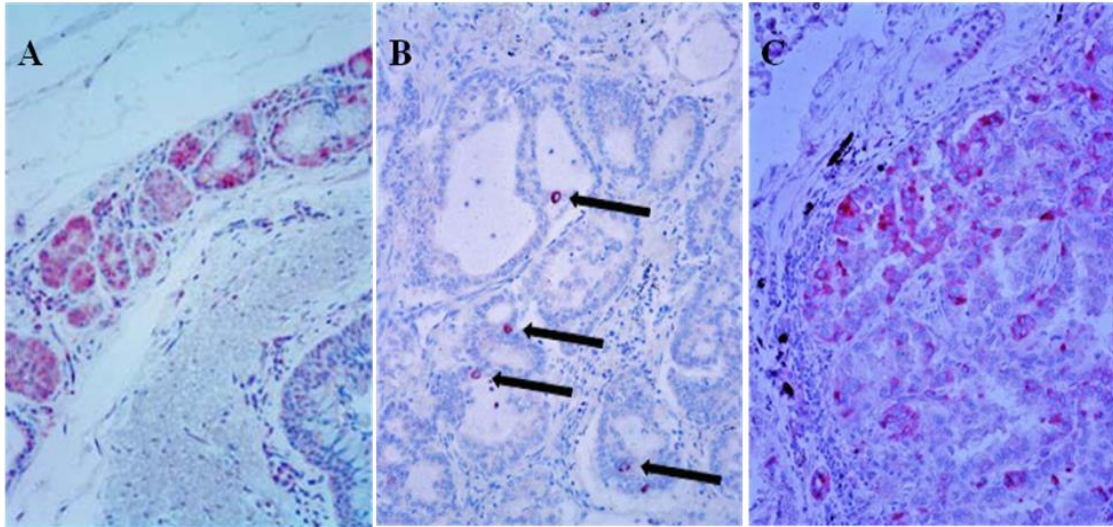
Az NSCLC sejtvonalak mellett humán NSCLC mintákban is vizsgáltuk az apelin kifejeződését mRNA szinten. Ehhez 46 NSCLC-vel kezelt beteg sebészi úton frissen eltávolított tumoros és normál tüdőszövetét használtuk. A 46 nem tumoros és tumoros mRNA extraktum pár kvantitatív valós idejű PCR analízise szerint az apelin expressziós szintek a betegek tumoros mintáiban szignifikánsan magasabbak voltak, mint a normál tüdőszövet mintákban ($p < 0.01$; **9. ábra**).



9. ábra

Kvantitatív valós idejű PCR analízis 46 tumoros és normál tüdőszövet minta apelin mRNS szintjének összehasonlítására. A box plot analízis szignifikáns eltérést mutat a tumorok és a normál tüdőszövet apelin mRNS szintje között NSCLC betegeknél ($p < 0.01$; $n = 46$).

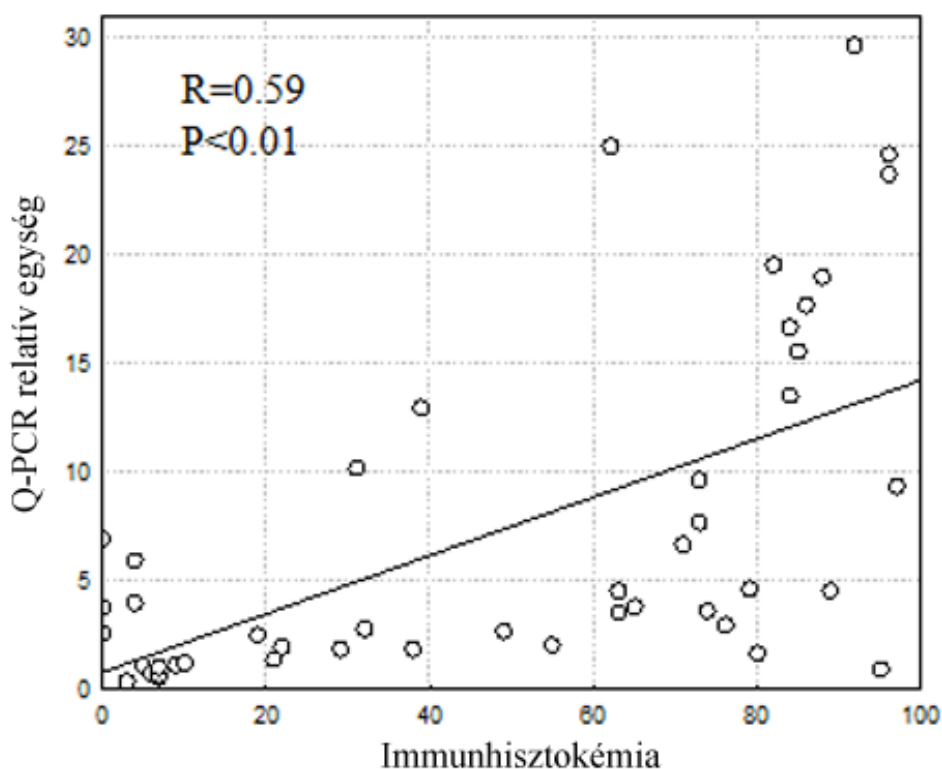
Az apelin kifejeződését protein szinten immunhisztokémiai jelöléssel vizsgáltuk. 94 NSCLC-vel kezelt beteg formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintájában az apelin megjelenése citoplazmás mintázatot mutatott. Az apelin protein a humán bronchiális mirigyekben és a tumorról határos epitheliumban fejeződött ki. Az alveoláris sejtek negatívak voltak. Az apelin jelölődésre tipikus példákat mutat daganatmintáinkban a **10.B** (alacsony expresszió) és a **10.C** (magas expresszió) **ábra**.



10. ábra

Normál tüdő- és NSCLC szövetek immunhisztokémiai jelölése az apelin expressziójának vizsgálatára. (A) Apelin immunjelölés a bronchiális mirigyekben a normál humán tüdőszövetben. (B,C) Immunhisztokémiai példák a fokális (B) és diffúz (C) apelin jelölődési mintázatokra (ami megfelel az alacsony és magas apelin expressziónak) humán NSCLC-ben. A nyilak apelint kifejező tumorsejteket mutatnak a tumoron belül. 200x-os nagyítás.

Ezt követően összehasonlítottuk az NSCLC mintákban mért apelin mRNA szinteket az immunhisztokémiával detektált protein expressziós szintekkel, és szignifikáns korrelációt találtunk ($p < 0.01$; **11. ábra**).

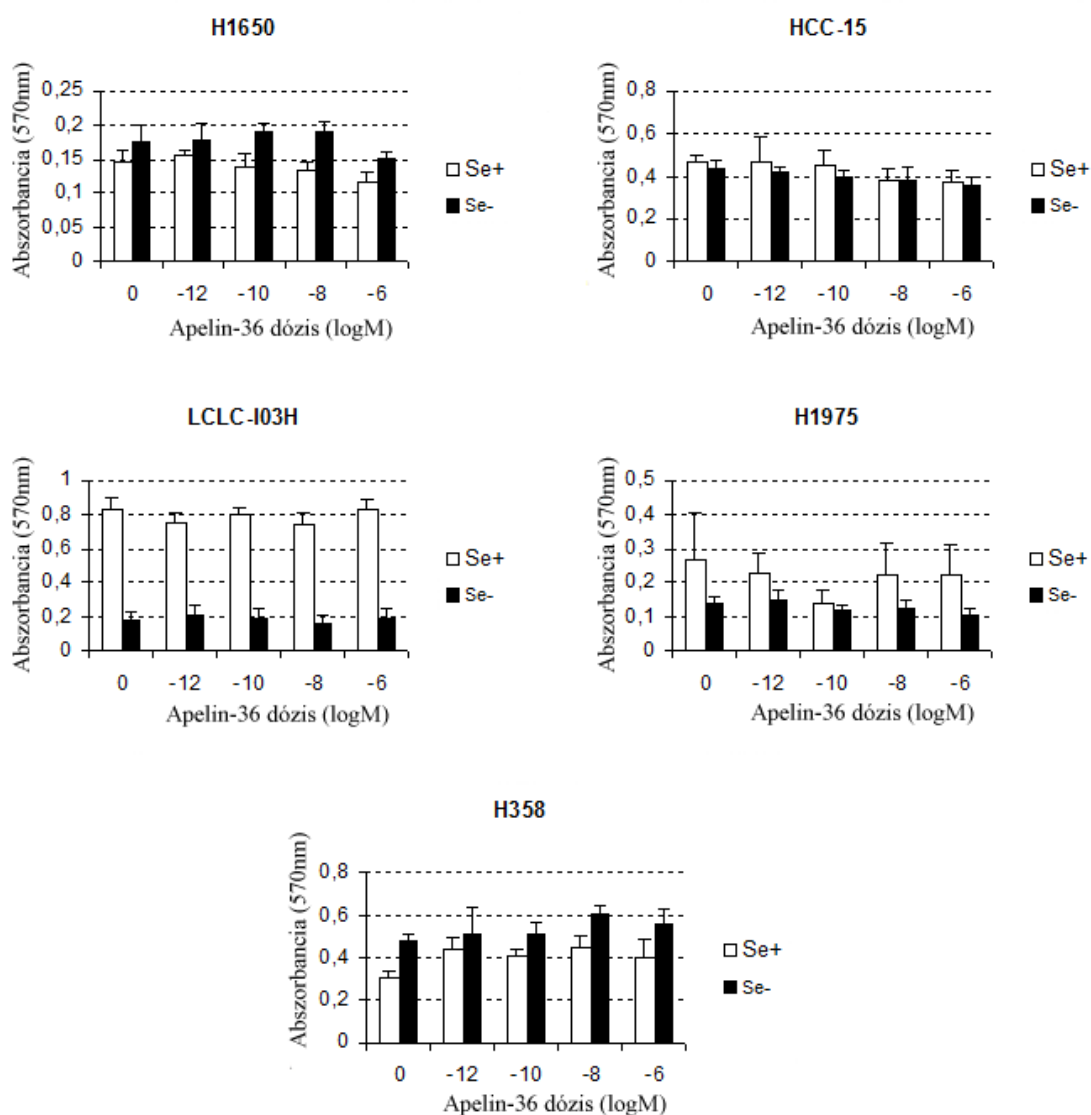


11. ábra

A humán NSCLC minták kvantitatív RT-PCR-rel mért apelin mRNS és immunohisztokémiával meghatározott apelin protein expressziójának összehasonlítása. Szignifikáns korrelációt találtunk ($n = 46$, $R = 0.59$, $p < 0.01$).

5.4 Exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatása az NSCLC vonalak növekedésére *in vitro*

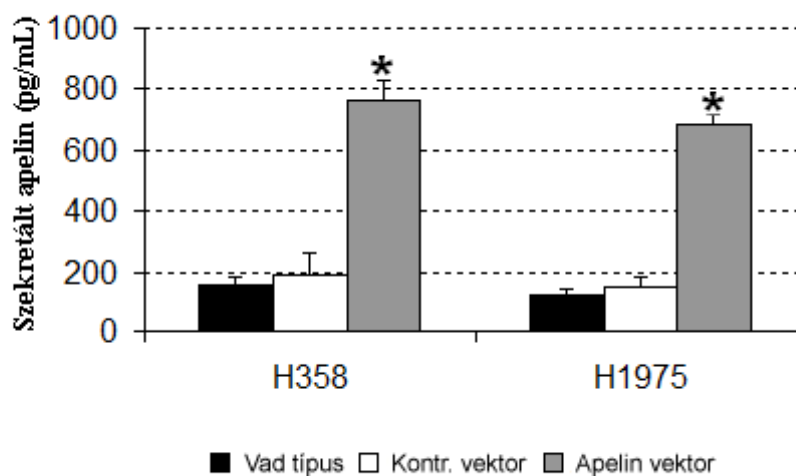
A következőkben proliferációs tesztekben vizsgáltuk az apelin különböző koncentrációival való kezelés hatását az NSCLC sejtvonalakon, hogy lássuk, az apelin autokrin módon befolyásolja-e az NSCLC vonalak növekedését. Az exogén apelin kezelés egyik koncentrációban sem befolyásolta a sejtek *in vitro* proliferációját a kezeltlen sejtekhez képest 72 órás kísérletben sem szérumos, sem szérummentes közegben (12. ábra).



12. ábra

In vitro proliferációs teszt NSCLC sejtvonalakkal. Az exogén apelin kezelés nem mutatott szignifikáns hatást vad típusú H1650, HCC-15, LCLC-I03H, H1975 és H358 sejtek *in vitro* proliferációjára. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD.

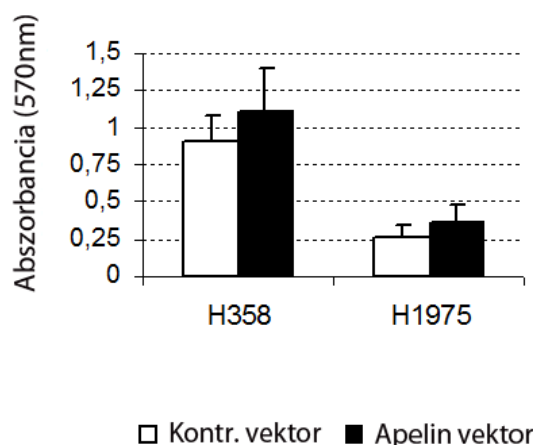
A továbbiakban a H358 és H1975 sejteket, amelyek viszonylag alacsony szinten fejezik ki az endogén apelint, stabilan transzfektáltuk apelin expressziós vektorral, hogy megnöveljük az apelin kifejeződésének mértékét. ELISA-val ellenőriztük az apelin celluláris szekréciójának mértékét a transzfekciót követően. A H358 és H1975 sejtvonalak genetikai módosítása a szekretált apelin szintjének szignifikáns emelkedését eredményezte (mindkét sejtvonal esetében $p < 0.05$; **13. ábra**).



13. ábra

*ELISA az apelin túltermelés hatásainak kimutatására apelin vagy kontroll vektorral stabilan transzfektált H358 vagy H1975 sejtek kondicionált médiumában a vad típusú sejtekhez hasonlítva. Az apelin vektorral stabilan transzfektált sejtvonalak apelin szekréciója a többszörösére emelkedett. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD; * $p < 0.05$ vs. kontroll.*

A következőkben proliferációs tesztben vizsgáltuk az apelin protein expressziós szint emelkedésének lehetséges hatását a sejtek növekedésén *in vitro*. Azt tapasztaltuk, hogy egyik apelin túltermelő sejtvonal sem mutatott megnövekedett proliferációt a kontroll vektorral transzfektált sejtekhez képest ($p > 0.05$ mindkét sejtvonalnál; **14. ábra**).

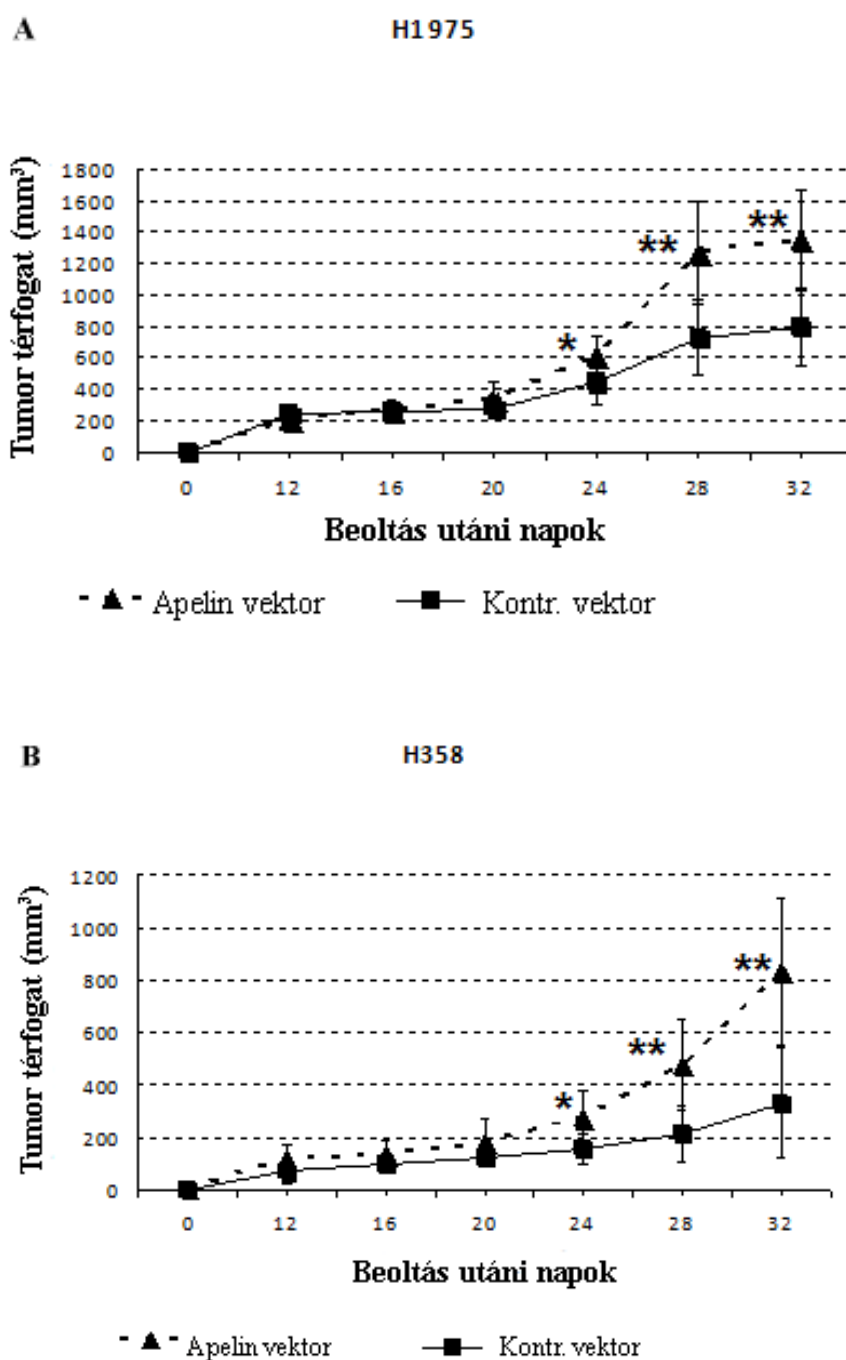


14. ábra

Az *in vitro* proliferációs teszt nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll vagy apelin expressziós vektorral transzfektált H358 és H1975 sejtek proliferációjában. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD.

5.5 Fokozott apelin expresszió hatása az NSCLC növekedésére *in vivo*

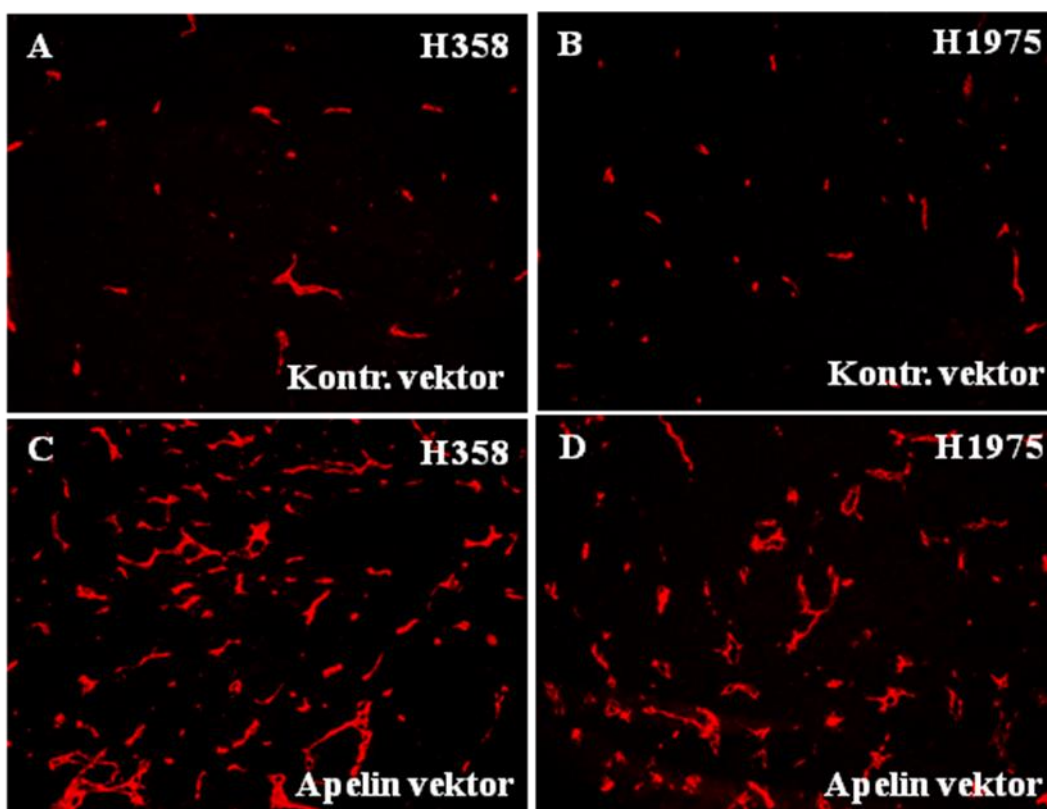
Ahogy már fentebb leírtuk, az exogén apelin (**12. ábra**) illetve az apelin túltermelése (**14. ábra**) nem befolyásolta az NSCLC sejtek növekedését *in vitro*. Teszteltük azonban az apelin hatását a NSCLC tumorok *in vivo* növekedésére is. Szubkután injektáltuk az apelin vagy kontroll vektorral transzfektált H358 vagy H1975 sejteket immundeficiens egerekbe, xenograft tumorokat létrehozva. Összevetettük a tumorok *in vivo* növekedését, és azt tapasztaltuk, hogy a tumorok növekedése gyorsabb volt az apelint túltermelő sejtekkel beoltott egerekben, a kontroll vektorral transzfektált sejteket hordozó egerekhez viszonyítva. Mind a H358, mind a H1975 sejtvonal esetében a beoltást követő 24. napon már szignifikánsan nagyobb tumortérfogatokat mértünk az apelin vektorral transzfektált vonalaknál a kontroll vektorral transzfektált vonalakhoz képest (**15.A-B ábra**).



15. ábra

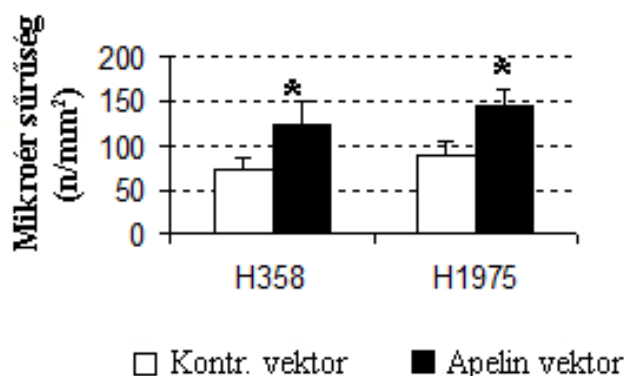
A genetikai módosítást követő apelin túlermelés serkenti a humán NSCLC vonalak *in vivo* növekedését. A kontroll vektorral és apelin vektorral transzfektált H1975 (A) és H358 (B) sejtek növekedési görbéi. A beoltást követő 24. napon már szignifikáns az eltérés mindkét vonal esetében. (■) és (▲) csoportonként 8 egér átlagát mutatja \pm SD; $p < 0.05$ és $p < 0.01$ vs. kontroll.

Ez a megfigyelésünk, hogy az apelin túltermelése serkenti a humán NSCLC vonalak *in vivo* növekedését, alátámasztja más tanulmányok eredményeit, amelyek az apelin molekula lehetséges angiogén hatásáról számolnak be különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerekben (Cox 2006, Kleinz 2004, Masri 2004, Kasai 2004, Sorli 2006, Sorli 2007). Ebből kiindulva mi is vizsgáltuk, hogy az apelin indukál-e érképződést a xenotranszplantált humán NSCLC vonalakban *in vivo*. A morfológiai analízis, amelynek során CD31-et használtunk az endotélsejtek jelölésére (**16.A-D ábra**), szignifikánsan nagyobb mikroér sűrűséget mutatott az apelin-túltermelő tumorokban a kontroll tumorokhoz képest ($p < 0.05$ a H358 és H1975 sejtvonal esetében is; **17. ábra**).



16. ábra

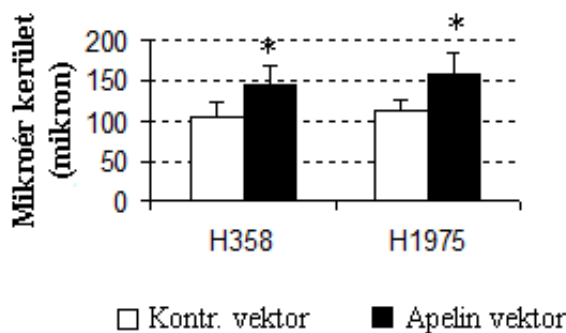
Az apelin túltermelése serkenti az NSCLC angiogenezisét in vivo. 32 napos apelin-túltermelő H358 (C) és H1975 (D) tumorok, valamint kontroll H358 (A) és H1975 (B) tumorok fagyasztott metszeteit jelöltük CD31 endotélsejt markerrel (piros fluoreszcencia). 200x-os nagyítás.



17. ábra

32 napos apelin túltermelő, valamint kontroll H358 és H1975 tumorok mikroér sűrűsége. Mindkét sejtvonal esetében az apelin túltermelő tumorok mikroér sűrűsége szignifikánsan nagyobb a kontroll tumorokhoz képest. A mikroér sűrűség a vérerek számát jelenti négyzetmilliméterenként. Az oszlopok 8 egér átlagát mutatják csoportonként $\pm SD$; * $p < 0.05$ vs. kontroll.

Ezenkívül összehasonlítottuk a tumorkapillárisok kerületét is, és azt tapasztaltuk, hogy az szignifikánsan nagyobb volt az apelin transzfektált tumorok esetén, összehasonlítva a kontroll vektorral transzfektált tumorokéval ($p < 0.05$; **18. ábra**).

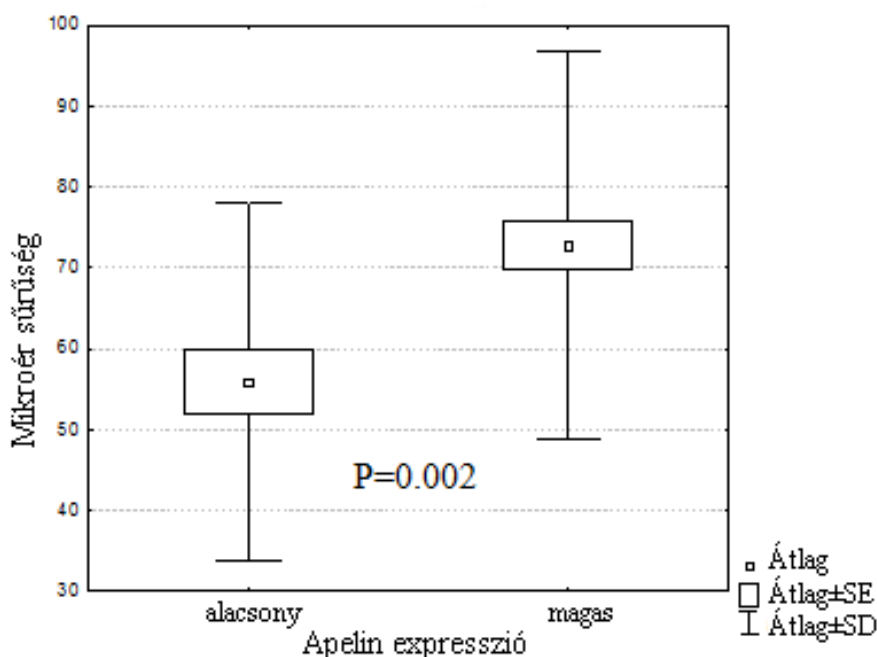


18. ábra

32 napos apelin túltermelő és kontroll H358 vagy H1975 tumorok mikroér kerülete, mikrométerekben kifejezve. Mindkét sejtvonal esetében szignifikánsan nagyobb az apelin túltermelő tumorokban a kontroll tumorokhoz képest. Az oszlopok 8 egér átlagát mutatják csoportonként $\pm SD$; * $p < 0.05$ vs. kontroll.

5.6 Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlító vizsgálata

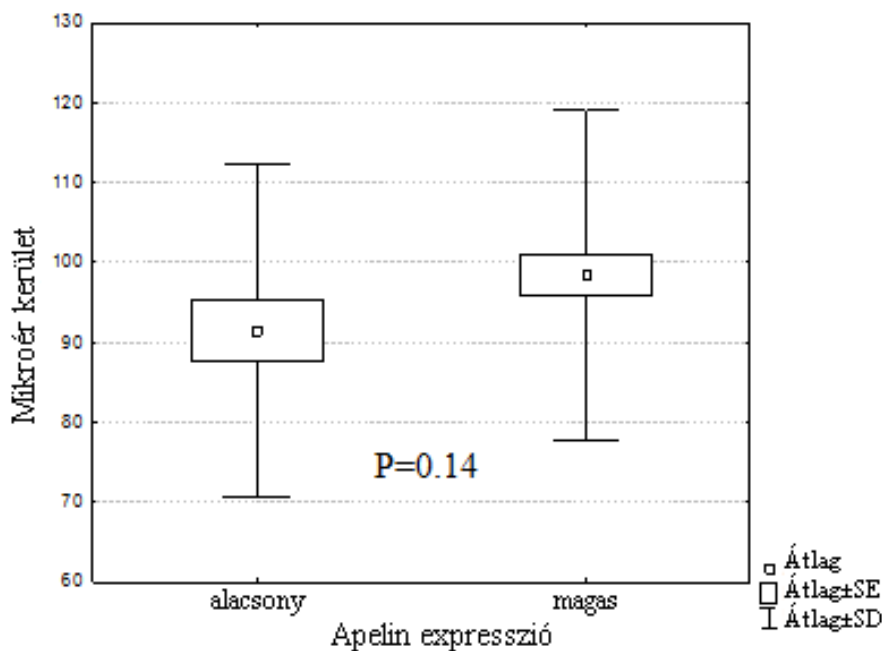
Az apelin expresszió klinikai jelentőségének meghatározásához, az apelin koncentráció és a klinikopatológiai változók összehasonlító statisztikai analízisét végeztük el (**1. táblázat**). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a korrallal, dohányzással, nemmel, tumor stádiummal (T), nyirokcsomó stádiummal (N) vagy szövettani típussal. Ugyanakkor az apelin lehetséges angiogén tulajdonságára utal az, hogy a magas apelin expresszió szignifikánsan gyakrabban párosult nagy érdenzitással a humán NSCLC mintákban ($p = 0.04$; **1. táblázat**). További vizsgálatainkban azt találtuk, hogy szignifikánsan nagyobb lett a magas apelin expresszáló tumorokban a vérerek számát jelölő anti-CD31 jelöléssel az alacsony apelin expressziójú tumorokhoz képest ($p = 0.002$; **19. ábra**).



19. ábra

A CD31 jelöléssel meghatározott mikroér sűrűség összehasonlítása az alacsony vs. magas apelin expressziójú humán NSCLC mintákban. Box plot analízis mutatja a medián értéket (centrális pontok), a 25-75%-os kvartilis tartományt és a minimum/maximum szinteket ($n=94$). A magas apelin expressziójú mintákban szignifikánsan magasabb a mikroér sűrűség ($p < 0.002$). A mikroér sűrűség a vérerek számát jelenti négyzetmilliméterenként.

Ezt követően tanulmányoztuk az összefüggést az apelin expresszió és az angiogén aktivitás között a humán NSCLC tumorokban a kapilláris kerületek meghatározásával is. Habár a mikroerek kerülete nagyobb volt a magas apelin expressziójú tumorok esetében, ez az eltérés a magas és alacsony apelin kifejező tumorok között statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0.14$; **20. ábra**).



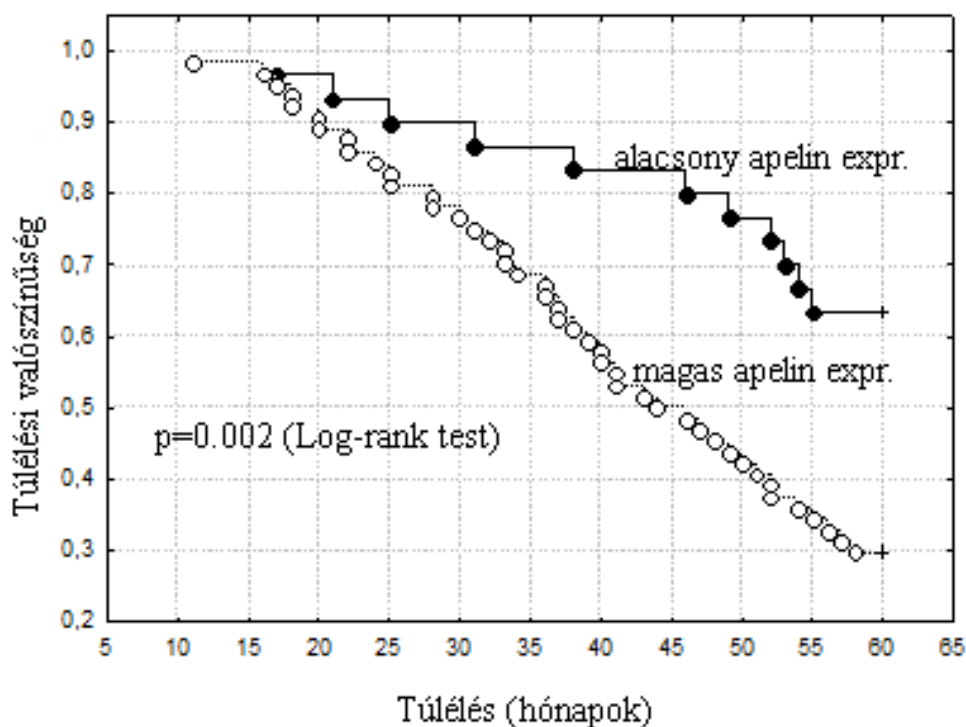
20. ábra

A CD31 jelöléssel meghatározott mikroér kerület összehasonlítása az alacsony vs. magas apelin expressziójú humán NSCLC mintákban Box plot analízis mutatja a medián értéket (centrális pontok), a 25-75%-os kvartilis tartományt és a minimum/maximum szinteket ($n=94$). Nagyobb a mikroér kerület a magas apelin expressziójú tumorokban, de az eltérés nem szignifikáns ($p < 0.14$). A mikroér kerület mikrométerben van kifejezve.

5.7 A megnövekedett apelin protein expresszió prognosztikus jelentősége

Ahogy a korábbiakban leírtam, a 94 NSCLC tumormintán immunhisztokémiai jelöléssel vizsgáltuk az apelin kifejeződését, és az apelin expressziójának mértéke alapján -, 1+, 2+ és 3+ kategóriákba soroltuk azokat. A következőkben összevetettük az egyes kategóriákba tartozó betegek túlélési idejét. Azt találtuk, hogy a - vagy 1+

csoportokba ($\leq 10\%$ apelin pozitív tumorsejt; alacsony apelin expresszió) tartozó betegek túlélési ideje szignifikánsan hosszabb volt a 2+ vagy 3+ kategóriákba ($> 10\%$ apelin pozitív tumorsejt; magas apelin expresszió) sorolt betegekhez képest. Az öt éves túlélési ráta a magas apelin kifejező betegeknél 29.9%-nak adódott, az alacsony apelin kifejezőknél pedig 63.3%-nak ($p = 0.002$, log-rank teszt; **21. ábra**).



21. ábra

Kaplan-Meier görbék az NSCLC betegpopuláció túlélésének jellemzésére az immunhisztokémiával meghatározott apelin koncentráció függvényében. A tumorok magas apelin koncentrációja szignifikáns prognosztikus faktor a túlélés tekintetében ($n=94$).

Ezt követően elvégeztük a standard prognosztikus paraméterek (tumor kiterjedés, nyirokcsomó stádium és életkor) multivariációs analízisét, és azt tapasztaltuk, hogy az apelin expresszió által prediktált kimenetel független a többi változótól ($p = 0.021$; **3. táblázat**). Egy másik prognosztikus faktornak adódott a nyirokcsomó stádium ($p < 0.01$; **3. táblázat**).

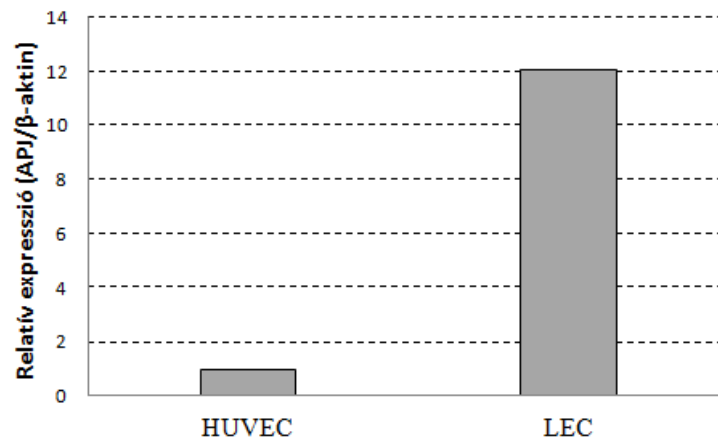
3. táblázat

Különböző prognosztikus faktorok multivariációs analízise NSCLC betegeknél (n = 94).

Prognosztikus faktor	RR	95% CI	P
Életkor években (<63 vs. >63)	1.577	0.9-2.761	0.111
Nem (férfi vs. nő)	0.547	0.289-1.036	0.064
Szövettan (AC vs. SCC/LC)	1.015	0.65-1.585	0.946
Patológiás T-stádium (T1 vs. T2-3)	0.94	0.711-1.243	0.664
Patológiás N-stádium (N0 vs. N1-2)	5.974	2.888-12.357	<0.001
Apelin-36 (alacsony vs. magas)	2.354	1.135-4.883	0.021

5.8 Az APJ receptor kifejeződésének vizsgálata humán nyirok endotél sejtvonalon kvantitatív PCR-rel és immuncitokémiával

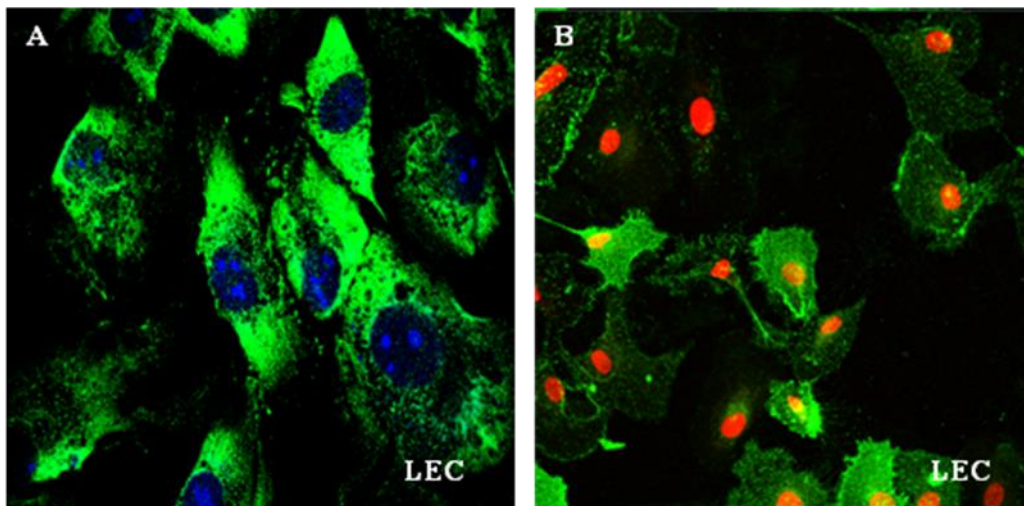
További vizsgálatainkat humán nyirok endotél sejtvonallal végeztük. A nyirokérképződés *in vitro* modelljeivel vizsgáltuk, hogy az apelin molekula jól dokumentált angiogén tulajdonsága mellett lymphangiogén hatással is rendelkezik-e. Első lépésben kvantitatív valós idejű PCR-rel kimutattuk, hogy a sejtvonal mRNS szinten kifejezi az APJ receptort. A relatív expressziós szint többszörös volt a HUVEC sejtekhez viszonyítva. (**22. ábra**)



22. ábra

Kvantitatív valós idejű PCR az APJ relatív expressziós szint megállapítására humán nyirok endotél sejtekben. A mért relatív expressziós szint többszörös a HUVEC sejtekhez viszonyítva.

A következőkben protein szinten vizsgáltuk az APJ receptor kifejeződését a nyirok endotél sejtvonalon immuncitokémiai jelöléssel. HUVEC sejtek esetében már leírták, hogy APJ immunreakció figyelhető meg a citoplazmájukban (Kleinz 2005). Ugyanezt tapasztaltuk nyirok endotél sejtek esetében is (**23.A ábra**). A sejteket egy nyirok endotél markerrel, podoplanin antitesttel is jelöltük, és pozitív immunreakciót láttunk (**23.B ábra**).

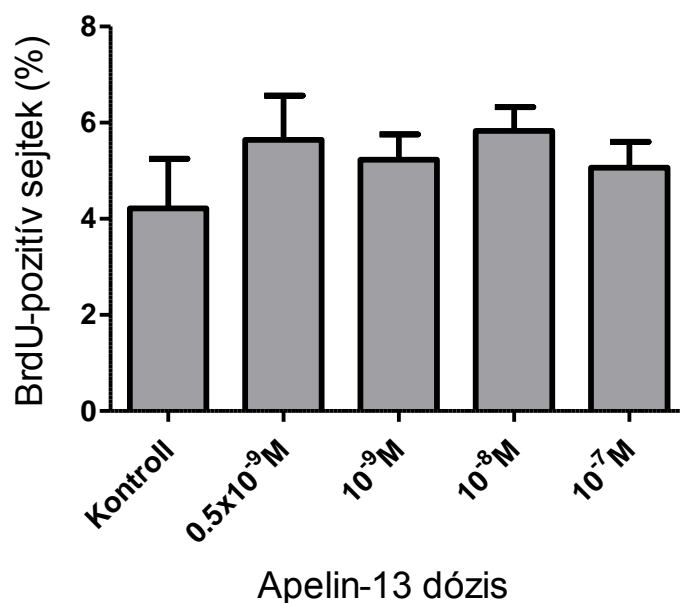


23. ábra

Immuncitokémiai jelölés humán nyirok endotél sejtekkel. (A) Jelölés anti-APJ antitesttel (zöld). Pozitív immunreakciót a citoplazmában látunk. A sejtmagokat TOTO-3 iodiddal festettük (kék). (B) Jelölés anti-podoplanin antitesttel (zöld). A sejtmagokat propidium-iodiddal festettük (piros).

5.9 Apelin hatásának vizsgálata a humán nyirok endotél sejtekre *in vitro*

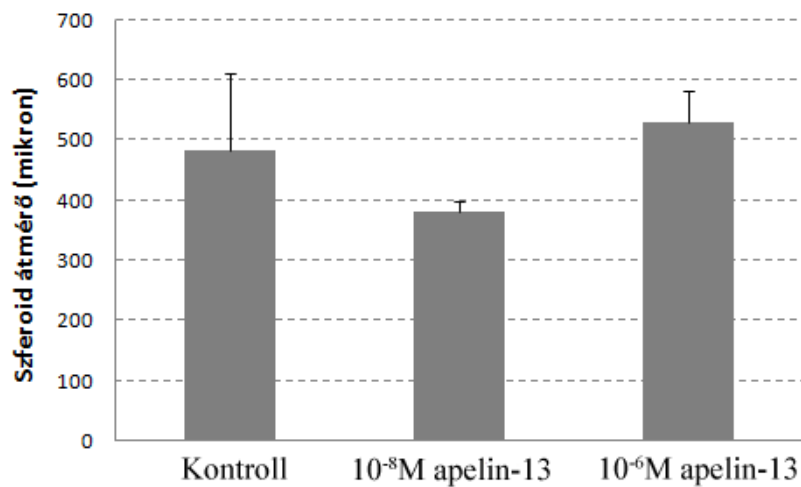
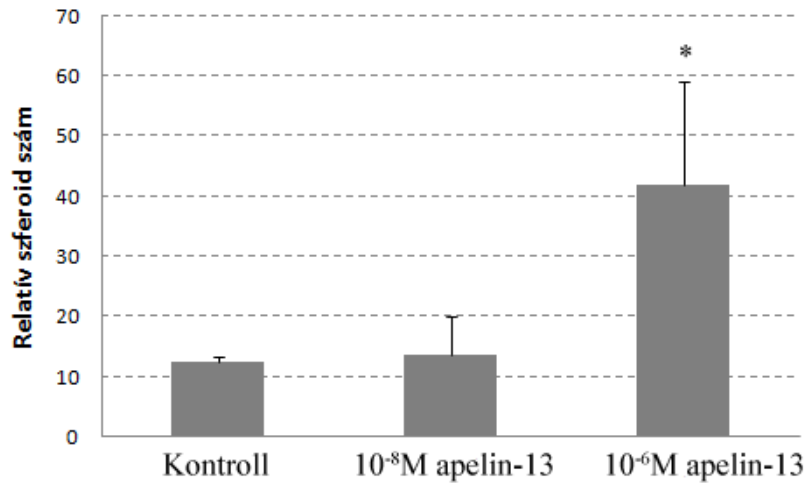
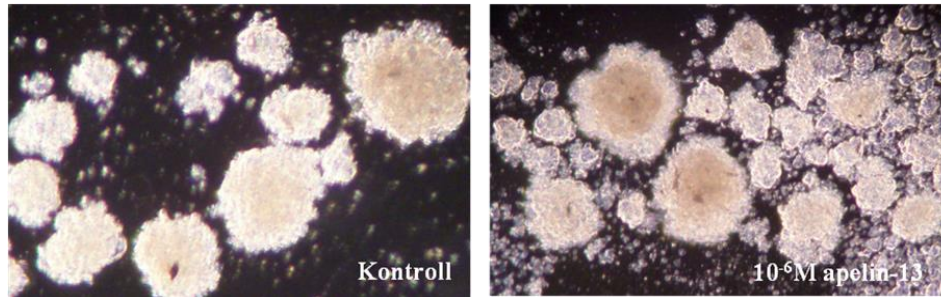
A következőkben vizsgáltuk, hogy exogén apelin kezelés befolyásolja-e a humán nyirok endotél sejtek proliferációját *in vitro*. A 96 órás proliferációs tesztben az apelin-13 különböző koncentrációival való kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a BrdU pozitív sejtek százalékát. (24.ábra)



24. ábra

*Az exogén apelin-13 kezelés hatása a humán nyirok endotél sejtek proliferációjára in vitro. Az apelin-13 kezelésnek nincs szignifikáns hatása a BrdU-pozitív sejtek százalékára. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD; * $p < 0.05$ vs. kontroll.*

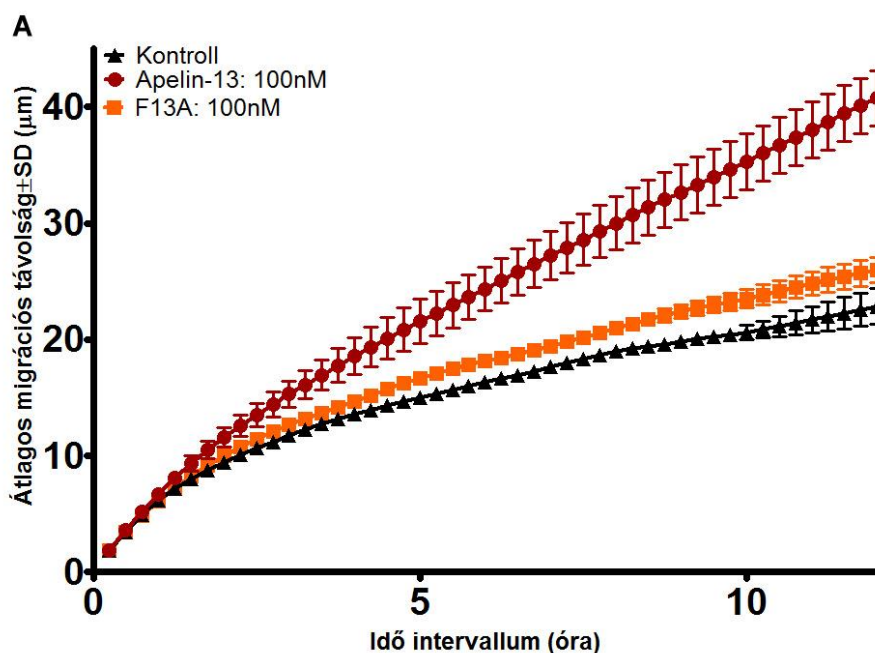
A 2D-s proliferációs vizsgálatot követően, letapadásmentes, szérumentes közegben vizsgáltuk, hogy a képződő szferoidok növekedését hogyan befolyásolja az exogén apelin kezelés. 96 óra elteltével számoltuk a szferoidok számát és átmérőjét. Azt találtuk, hogy az exogén apelin-13 kezelés 10^{-8} M-os koncentrációban nem befolyásolta sem a szferoidok számát, sem az átmérőjét. A nagyobb, 10^{-6} M-os koncentrációban az átmérőt nem befolyásolta, a szferoidok számát ugyanakkor szignifikánsan növelte. (25. ábra)

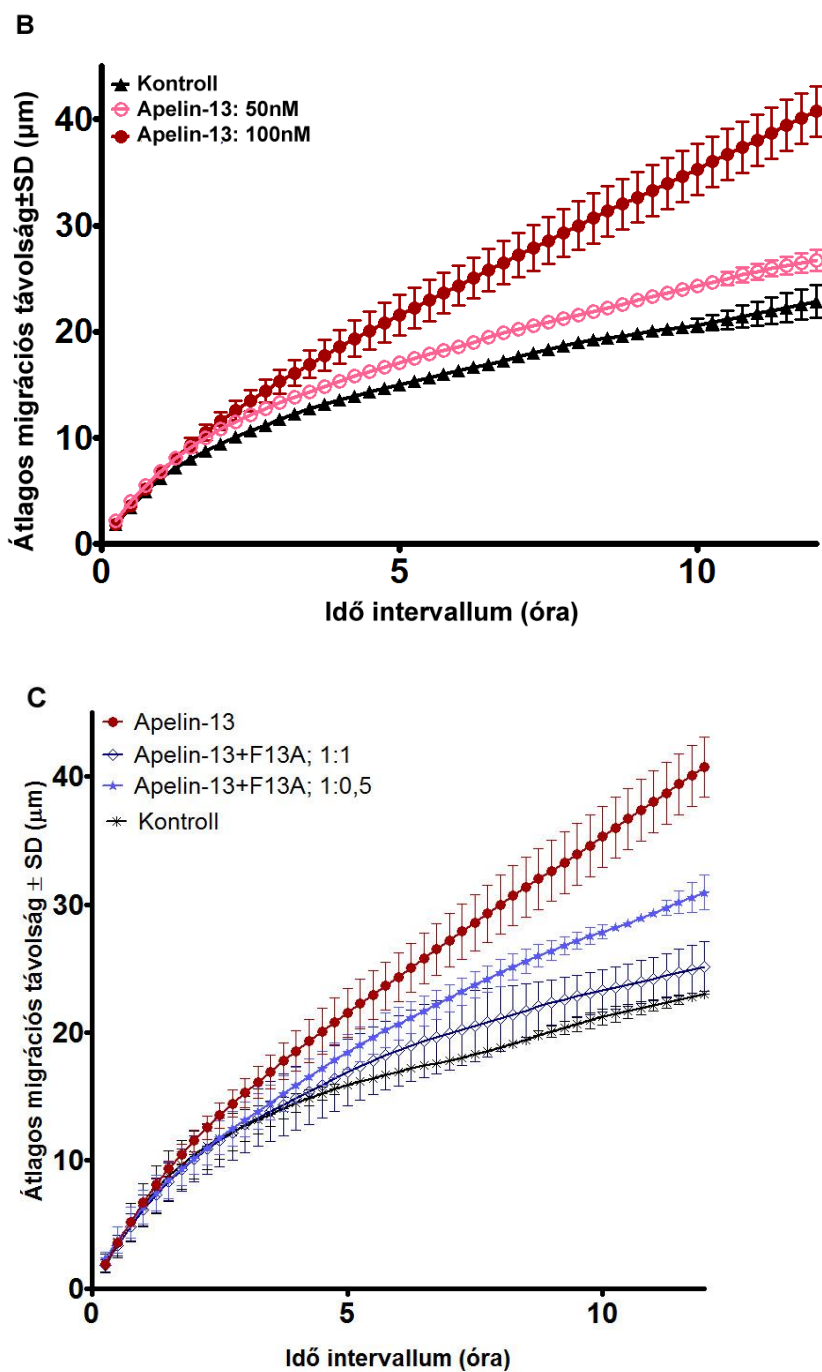


25. ábra

Exogén apelin kezelés hatása humán nyirok endotél sejtek szferoid képzésére. A felső két képen a szferoidokról készült fotók láthatóak: kontroll vs. $10^{-6}M$ apelin-13 kezelt szferoidok. Alatta a grafikonok a nyirok endotél sejtek által formált szferoidok relatív számát és átmérőjét mutatják: a kezeletlen vs. $10^{-8}M$ és $10^{-6}M$ koncentrációjú apelin-13-mal kezelt sejtek esetében. A szferoidok relatív számát szignifikánsan növelte $10^{-6}M$ koncentrációjú apelin-13 kezelés. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják $\pm SD$; * $p < 0.05$ vs. kontroll.

Mivel a nyirokerek kialakulásában fontos szerepe van a sejtek mozgásképeségének, vizsgáltuk, hogy az apelinnek van-e hatása a humán nyirok endotél sejtek motilitására *in vitro*. Apelin-13-mal illetve F13A-val kezeltük a sejteket, különböző dózisokban, és kombinációs kezeléseket is végeztünk. Eredményeink azt mutatják, hogy az apelin-13 szignifikánsan serkentette a sejtek migrációs képességét a kontroll, kezeletlen sejtekhez képest, míg az F13A kismértékben fokozta azt (**26.A ábra**). Tanulmányoztuk azt is, hogy az exogén apelin-13 hatása a sejtek migrációjára dóziszfüggő-e. Azt találtuk, hogy 100nM-os koncentrációban érvényesül a serkentő hatás. 50nM-os koncentrációban már csak kismértékű a serkentés (**26.B ábra**). Majd kombinációs kezeléseket végeztünk. Az apelin-13 100nM-os koncentrációban tapasztalt jelentős motilitást serkentő hatását az F13A 1:1 arányban adva jelentősen lecsökkenti. Ez a gátló hatása az F13A-nak kevésbé érvényesül, ha az apelin-13 és F13A aránya 1:0.5. (**26.C ábra**).

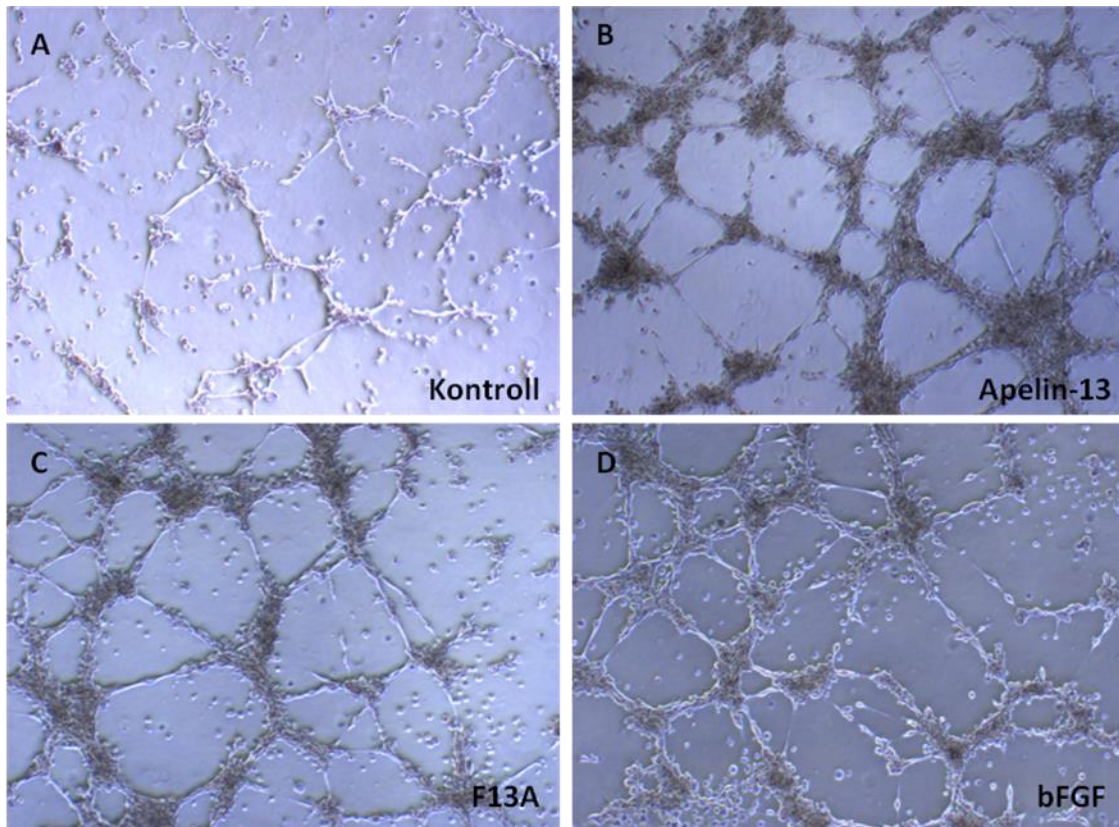


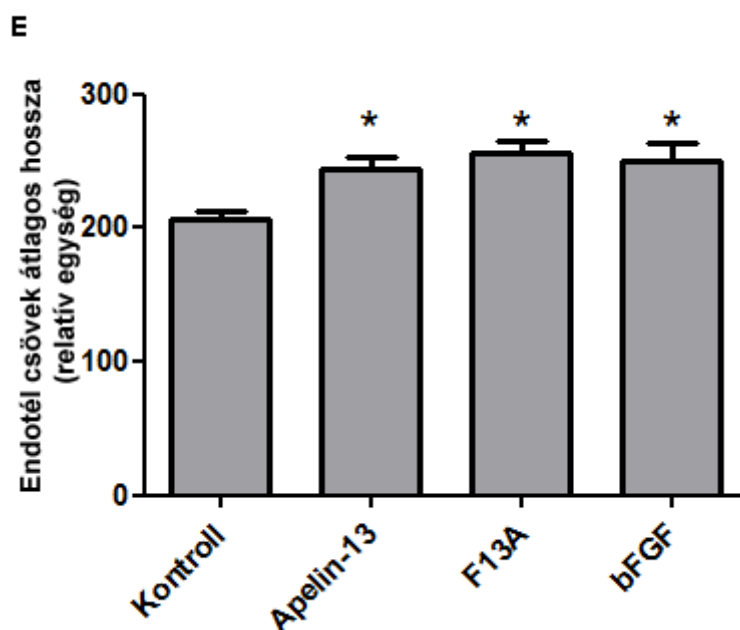


26. ábra

In vitro sejtmozgási vizsgálat nyirok endothél sejtekkel. (A) A nyirok endothél sejtek átlagos migrációs távolsága 100nM-os koncentrációjú apelin-13 vagy F13A kezelés esetében. Jelentős motilitást serkentő hatást az apelin-13 esetében látunk. (B) Az apelin-13 motilitást serkentő hatása a nyirok endothél sejtekre dóziszfüggő. (C) Kombinált kezelések hatása a nyirok endothél sejtek motilitására. Az apelin-13 motilitást serkentő hatását az F13A 1:1 arányban adva jelentősen gátolja.

Tanulmányoztuk azt is, hogy exogén apelin illetve apelin származékokkal való kezelés hogyan befolyásolja a humán nyirok endotél sejtek endotél csövekké való formálódását. Pozitív kontrollként bFGF-et használtunk. A kezeletlen nyirok endotél sejtekhez képest az apelin-13-mal és bFGF-fel kezelt sejtek esetében is a formálódó csövek átlagos hossza szignifikánsan nagyobbak bizonyult. Ugyanezt tapasztaltuk az F13A-val kezelt sejtek esetében is (**27.E ábra**). Amíg a kezeletlen sejtek esetében (**27.A ábra**) a sejtsomókból kiinduló csövek nagy része nem alkot összefüggő hálózatot, addig az apelin-13 (**27.B ábra**), az F13A (**27.C ábra**) és a bFGF (**27.D ábra**) esetében a sejtsomókból kiinduló legtöbb kapcsolat összefüggő hálózatot alkot.

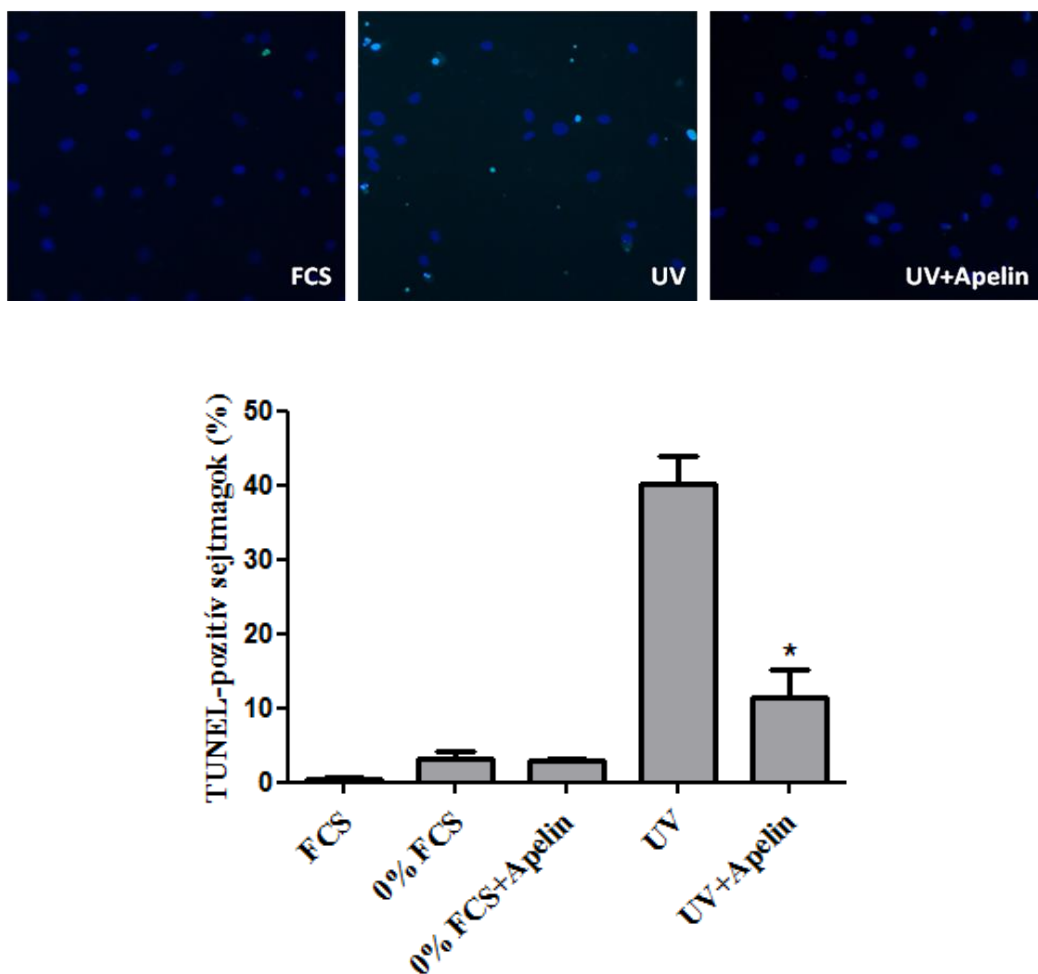




27. ábra

Endotél cső esszé nyirok endotél sejtekkel, ha a sejtek kezeletlenek (A), illetve apelin-13-mal (B), F13A-val (C) vagy bFGF-fel (D) kezelték. (E) A formálódó csövek átlagos hossza szignifikánsan nagyobb az apelin-13-mal, az F13A-val és bFGF-fel kezelt sejtek esetében a kezeletlen sejtekhez képest. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD; * $p < 0.05$ vs. kontroll.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy az apelinnek van-e hatása a humán nyirok endotél sejtek viabilitására. Ehhez apoptózist indukáltunk a nyirok endotél sejteken szérum megvonással illetve UV-sugárzással. Azt találtuk, hogy a szérum megvonása nem befolyásolta jelentősen a TUNEL-pozitív sejtmagok számát, míg az UV-sugárzás nagymértékben növelte azt. Az UV-sugárzás apoptózis indukáló hatását ugyanakkor szignifikánsan csökkentette exogén apelin kezelés (28. ábra).

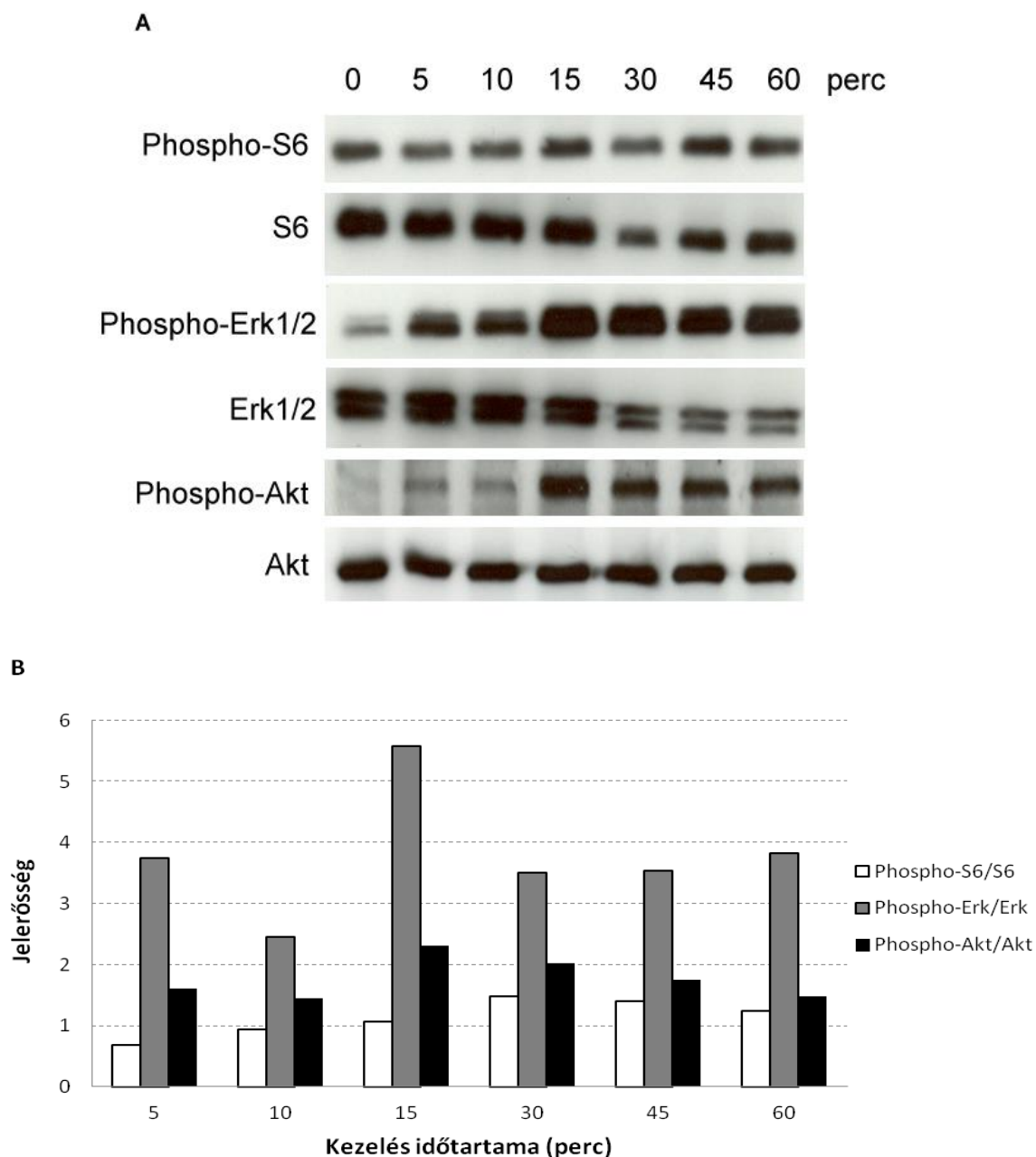


28. ábra

TUNEL kísérlet nyirok endotél sejtekkel. A felső ábrákon a DAPI fedőfolyadékkal lefedett sejtek láthatóak a szérumos (FCS), az UV kezelt, valamint az UV+apelin kezelt esetben. Az alsó grafikon mutatja a TUNEL-pozitív sejtmagok százalékát. Jól látszik, hogy az UV apoptózis indukáló hatását szignifikánsan csökkentette az apelin kezelés. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD; * $p < 0.05$ vs. kontroll.

Western blot analízissel azt vizsgáltuk, hogy milyen, az APJ szignálútvonalba (4. ábra) eső molekulákat aktivál az apelin kezelés a nyirok endotél sejtekben. Az apelin-13 serkentette az Erk1/2 aktivitását, az aktiváció csúcsát 15 percnél tapasztaltuk. Az apelinrel történő kezelés fokozta az Akt molekula aktivitását is, az aktivációs szint csúcsát ebben az esetben is 15 percnél tapasztaltuk. Az S6 molekula kismértékű aktivációját csak később, 30 percnél tapasztaltuk, ami arra is utal, hogy a pS6 downstream targetje lehet az Akt molekulának. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy

az apelin serkentheti az Erk és PI3K/Akt jelátviteli útvonalat nyirok endotél sejtekben. (29. ábra)

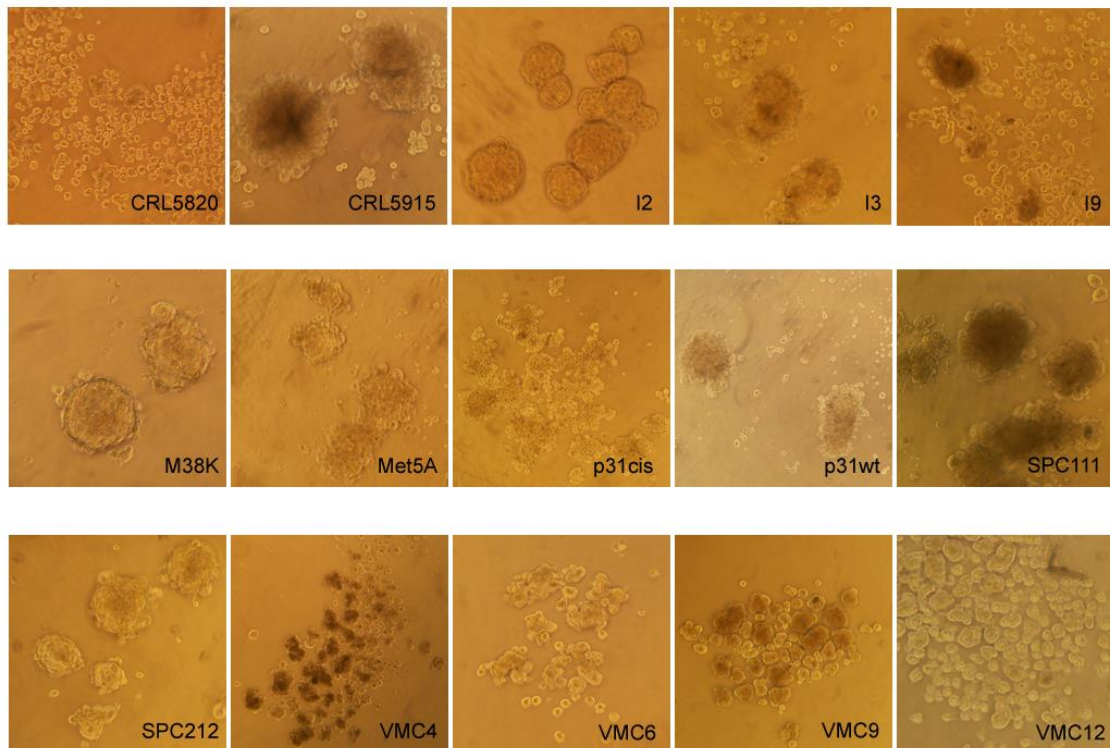


29. ábra

Az apelin-13 hatása az S6, az Erk és az Akt molekulák aktivációjára humán nyirok endotél sejtekben. (A) A western blothoz a sejteket lizáltuk, $10^{-6}M$ apelin-13-mal kezeltük (5; 10; 15; 30; 45; 60 perc), majd pS6, S6, pErk, Erk, pAkt és Akt antitestekkel inkubáltuk. (B) Az oszlopdiaagramm a pS6/S6, a pErk/Erk és a pAkt/Akt jelerősségét mutatja a kontroll, kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

5.10 Mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitásának jellemzése és az mTOR gátlás hatása a szferoidképzésre

A következőkben 15 mesothelioma sejtvonal szferoidképző tulajdonságát vizsgáltuk letapadásmentes közegben, szérumentes médiumban. A szérum-független és nem-adherensen növekedő multicelluláris tumorszferoidok ugyanis bővelkednek a megnövekedett tumorképző kapacitással rendelkező sejtek alpopulációiban. 24; 96; 168 és 240 óránál vizsgáltuk a sejtek szferoidképző tulajdonságát. A 15 sejtvonalból egyértelmű 3D-s szferoidokat 6 sejtvonalnál tapasztaltunk. Egnél (CRL5820) a sejtek egyáltalán nem álltak össze, 8 sejtvonal esetében pedig a sejtek nem határozott szerkezetű halmazokat képeztek. (30. ábra, 4. táblázat).



30.ábra

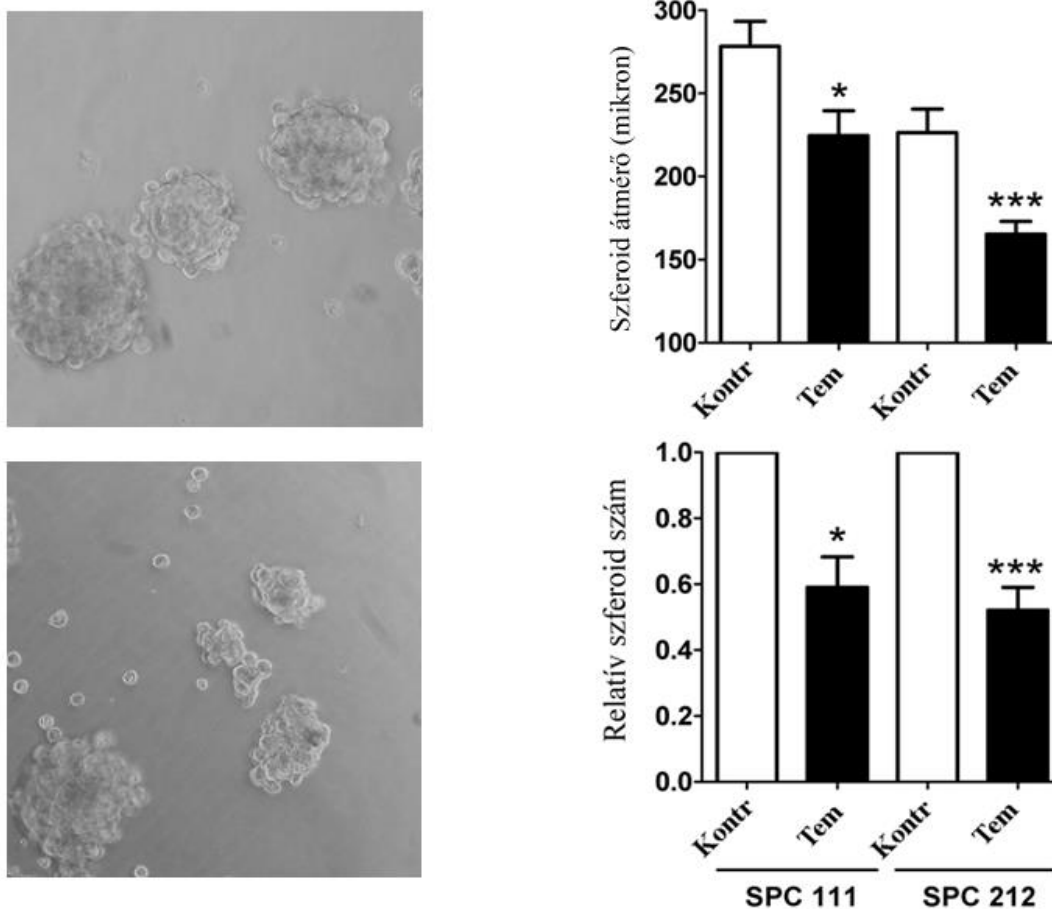
A 15 mesothelioma sejtvonal növekedése letapadásmentes, szérumentes közegben.

4. táblázat

Humán mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitásának jellemzése.

Mesothelioma sejtvonal neve	Szferoidképző tulajdonság			
	24 óra	96 óra	168 óra	240 óra
CRL 5820	-	-	-	-
CRL 5915	-	szferoid	szferoid	szferoid
I2	-	szferoid	szferoid	szferoid
I3	-	szferoid	szferoid	szferoid
I9	-	szferoid	szferoid	szferoid
M38K	-	átmeneti	átmeneti	átmeneti
Met5A	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz
p31 cis	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz
p31 wt	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz
SPC 111	-	szferoid	szferoid	szferoid
SPC 212	-	szferoid	szferoid	szferoid
VMC4	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz
VMC6	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz
VMC9	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz
VMC12	-	sejthalmaz	sejthalmaz	sejthalmaz

A 15 mesothelioma vonalból 2 sejtvonalat (SPC 111 és SPC 212) választottunk ki, amelyek egyértelmű szferoidokat képeztek, és vizsgáltuk, hogy az mTOR gátlása temsirolimus által hatással van-e erre a tumor „őssejtszerű” sejtpopulációra (**31. ábra**). A temsirolimus kezelés az MPM szferoid integritásra már 4 nap után negatív hatást gyakorolt (**31. ábra, bal oldal**), és szignifikánsan csökkentette a szferoidok számát és átlagos átmérőjét is (**31. ábra jobb oldal**). Ez alapján feltételezhetjük, hogy a temsirolimus kezelésnek egyértelmű hatása van az MPM sejtvonalak tumor iniciáló sejt kompartmentjére.



31.ábra

A temsirolimus hatása humán MPM sejtvonalak (SPC 111 és SPC 212) szféroid képzésére. A bal oldali ábrán az SPC111 sejtek reprezentatív fotói a szféroid integritásában okozott kárt mutatják az mTOR gátlás által. A felső képen a kezeltlen, kontroll szféroidok láthatóak, az alsón a temsirolimus kezelés utániak. A szféroidok méretében és számában okozott hatást a jobb oldali ábrák mutatják. Mindkét sejtvonal esetében a temsirolimus kezelés szignifikánsan csökkentette mind a szféroidok átmérőjét, mind a relatív szféroid számot. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SD; * $p < 0.05$, *** $p \leq 0.0005$, vs. kontroll.

6 MEGBESZÉLÉS

Az utóbbi években egyre inkább előretörnek a molekulárisan célzott terápiák, amelyeknél a lehetséges célpontok egyrészt egyes kismolekulákkal vagy ellenanyagokkal gátolható onkogén fehérjék, másrészt az angio- és lymphangiogenezis. Így az érdeklődés középpontjába kerültek az újonnan felfedezett angiogén molekulák is, melyek közé tartozik az apelin molekula. Az apelinről leírták, hogy serkenti az endotél növekedést különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerekben (Cox 2006, Kleinz 2004, Masri 2004, Kasai 2004), újabb tanulmányok számolnak be expressziójáról humán daganatokban (Heo 2012, Kálin 2007, Wang 2008) és angiogén tulajdonságáról rágszáló tumorokban (Kidoya 2012 Jul, Sorli 2006, Sorli 2007). Mindemellett nem kísérelték még megbecsülni az apelinerg rendszer szerepét az NSCLC beereződésében, és nincsenek adatok ennek klinikopatológiai jelentőségéről sem. Legjobb tudásunk szerint elsőként mutattunk ki összefüggést az apelin expressziója és egy humán daganattípus beereződése és klinikai kimenetele között.

A tüdőrák világszerte élenjáró volt a leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedések között a férfiak körében, és negyedik helyen szerepelt a nők körében 2008-ban. Ugyancsak első helyen szerepelt a tumoros megbetegedések okozta halálesetekben férfiak körében, második helyen a nők körében. Így mindkét nem esetében a tüdőrák egyike a klinikai onkológia fő kihívásainak. (Jemal 2011). NSCLC esetében még a sebészileg rezekálható, kevésbé előrehaladott stádiumú esetekben is, a betegek több mint 50%-ánál áttét fejlődik 5 éven belül. Bár még nem teljesen értjük az NSCLC különösen rossz prognózisának hátterében álló mechanizmusokat, preklinikai bizonyítékok széles köre az angiogenezist azonosítja, mint agresszív biológiai viselkedést támogató kulcsfolyamatot. Ennek megfelelően számos olyan molekulát vizsgáltak, amelyek az NSCLC érhálózatát célozzák. Az antivaszkuláris gyógyszerekkel végzett klinikai vizsgálatok eredményei azonban egyszerre biztatóak és kiábrándítóak (Giaccone 2007, Amir 2009), így ezen terápiák sikeréhez kétségtelenül mélyebb ismeretekre van szükségünk az NSCLC-t kontrolláló angiogén faktorok klinikai jelentőségéről.

Az apelinről kimutatták, hogy nagymértékben kifejeződik a normál tüdőszövetben (Kawamata 2001), és leírták már az apelin gén megnövekedett

expresszióját különféle szolid tumorokban is, a tüdőrákot is beleértve. (Sorli 2007, Ameri 2010). Munkacsoportunk vizsgálta az apelin kifejeződését mind a normál, mind a tumoros humán tüdőszövetben (**9. ábra**). A kvantitatív RT-PCR azt mutatta, hogy az apelin overexpresszálódik a frissen fagyasztott NSCLC mintákban mRNS szinten, és ez korrelál a megfelelő formalin-fixált, paraffinba ágyazott patológiai mintákban immunhisztokémiával detektálható protein szintekkel (**11. ábra**). Emellett az apelin és receptora is kifejeződött valamennyi vizsgált NSCLC vonalban is (**6. ábra**). Bár az NSCLC vonalakban genetikai módosítással megnövelt apelin expresszió fokozott tumornövekedést eredményezett *in vivo* (**15. ábra**); a sejtek proliferációját *in vitro* sem az exogén apelin kezelés (**12. ábra**), sem az apelin transzfekció (**14. ábra**) nem befolyásolta. Így Sorli és mtsai. eredményeivel összhangban, akik egér melanóma (Sorli 2006) és emlőkarcinóma (Sorli 2007) esetében vizsgáldtak, mi is arra a következtetésre jutottunk, hogy az apelin szerepet játszik az NSCLC progressziójának serkentésében is *in vivo*, bár ez a serkentő hatás nem egy autokrin szabályozási mechanizmus révén valósul meg.

Az apelin jól dokumentált angiogén funkciói (Cox 2006, Kleinz 2004, Masri 2004, Kasai 2004, Sorli 2006, Sorli 2007) és a saját eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy az apelin molekula a vérerekapillárisokra gyakorolt stimuláló hatás révén serkenti az NSCLC tumorok növekedését. Vizsgáltuk az összefüggést az apelin kifejeződés mértéke és az NSCLC-vel kezelt betegek tumoros mintáinak angiogén fenotípusa között is, és azt találtuk, hogy a nagymértékű apelin-expressziót mutató tumorokban a mikroerek száma szignifikánsan több volt, mint az apelint kismértékben kifejezőkben (**19. ábra**). Ezt az eredményt alátámasztotta az a megfigyelésünk is, hogy a transzfektált humán NSCLC vonalak apelin túltermelése szignifikánsan megnövelte szubkután tumoraikban az intratumorális mikroerek számát nude egerekben (**17. ábra**).

Az apelin-túltermelő kísérleti tumorokban nemcsak az intratumorális kapillárisok nagyobb számát találtuk, de az erek területének szignifikáns növekedését is (**18. ábra**). Bár azoknál az NSCLC-vel kezelt betegeknél, akiknek a tumor mintáiban nagyfokú apelin protein expressziót detektáltunk, nagyobb méretűek voltak az intratumorális vérerek, mint azoknál, akiknél az apelin expresszió kismértékű volt, ez a tendencia nem mutatkozott szignifikánsnak (**20. ábra**). Ennek háttérében a szubkután növekvő kísérleti és a humán tumorok mikrokörnyezete között adódó különbségek

(mint pl. az extracelluláris mátrix komponensek vagy mechanikai erők) állhatnak. Bár több nemrégiben megjelent tanulmány is vizsgálja az apelin indukálta angiogenezis lehetőségét fejlődési (Kidoya 2008) és kísérleti tumor modellekben (Sorli 2007); a mi klinikai mintáink alapján kapott eredményeket alapul véve nehéz azt a következtetést levonni, hogy a humán NSCLC vaszkularizációja folyamán a vérerek növekedése biztosan az apelin hatásának tulajdonítható.

Saját fenti, humán NSCLC mintáinkban tapasztalt megfigyeléseink alapján, inkább azt feltételezhetjük, hogy az apelin elsősorban "elágaztató" faktorként hat a vaszkularizáció folyamatában. Erre utalnak más szerzők chorioallantois membrán kísérletekben kapott eredményei is, amelyekben például az apelin 2.5-szer serkentette a kapilláris elágazást a kontrollhoz képest. Ez az érték ekvivalens a VEGF által indukált elágazással (Rayalam 2008).

Az NSCLC mintáinkban, az apelin kifejeződés mértéke és a tumorok angiogén fenotípusa között megfigyelt összefüggés, valamint azon kísérleti és klinikai bizonyítékok alapján, amelyek ezidáig összegyűltek az angiogenezis NSCLC progressziójában betöltött szerepéről (Amir 2008, Giaccone 2007, Amir 2009), felvetődött a kérdés, hogy van-e kapcsolat az NSCLC-vel kezelt betegeknél az apelin expressziójának mértéke és a klinikopatológiai paraméterek között. Az öt éves követési periódus alatt szignifikánsan magasabb volt az NSCLC okozta halálozás azon betegeknél, akiknél nagymértékű volt az apelin expressziója összevetve azon betegekkal, ahol kismértékű volt (**21. ábra**). A nagymértékű apelin expressziót független faktornak találtuk a betegség prognózisára vonatkozóan (**3. táblázat**). Így tanulmányunk elsőként számol be humán NSCLC esetében az apelin kifejeződéséről és fontos prognosztikus szerepéről mint angiogén faktor, mely utóbbi tulajdonsága következtében fokozza az NSCLC agresszív viselkedését. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a szolid tumorok beereződési folyamata a proangiogén faktorok és inhibitorok ellentétes hatásai által szabályozott, mely hatások egyensúlya változhat a tumor progressziójának folyamata során (Döme 2007). Ezt az elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, miszerint retinában az apelin molekula együttműködve a VEGF-fel vagy az FGF-fel szabályozza a patológiás beereződést (Kasai 2008). Így további vizsgálatok szükségesek, hogy igazoljuk a kapcsolatot az apelin és más angiogén molekulák között nemcsak NSCLC esetében, de más humán szolid tumorokban is.

Mindemellett új eredményeink alapján az NSCLC-re jellemző angiogén molekulák csoportja bővül az apelinnel, és így a jövő feladata lehet az apelin jelátvitelt megcélzó terápiák fejlesztése.

A tumorok beereződésével kapcsolatos nagyszámú vizsgálat mellett, a lymphangiogén növekedési faktorok tanulmányozása is az érdeklődés középpontjába került az utóbbi években, hiszen a nyirokrendszer közvetlenül és közvetve is számos betegség pathogenezisében érintett. Azonban a nyirokérképződés molekuláris mechanizmusairól szerzett tudásunk még messze elmarad az érrendszerrel kapcsolatos ismereteinktől. Ugyanakkor a közelmúltban megjelent tanulmányok arra utalnak, hogy a lymphangiogenezis is egy összetett folyamat, amelyet a leginkább tanulmányozott VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 kaszkádtól részben független jelátviteli útvonalak is szabályoznak (Albrecht 2011; Hosking 2007; Karpanen 2008; Schulte-Merker 2011; Tammela 2010). Így újabb vizsgálatok szükségesek a nyirokrendszer biológiájának jobb megértéséhez és új lymphangiogén molekulák azonosításához, amelyek hatékonyabb terápiás szerek célpontjai lehetnek a nyirokrendszer zavaraihoz kapcsolódó betegségek kezelésében.

Az eddigi vizsgálatok alapján jól megalapozott, hogy az apelinerg rendszer fontos szerepet játszik a vérérképződés során. Az apelin molekuláról mint lehetséges lymphangiogén faktorról azonban a tudásunk még meglehetősen korlátozott. Jelenleg mindössze egy tanulmány szerepel az irodalomban, amely az apelin molekula lehetséges szerepét vizsgálja a nyirokérképződés folyamatában. Ebben az apelin serkentette a nyirok endotél sejtek migrációját, érhálózat képződését és stabilizációját, emellett csökkentette a kapillárisok UVB-indukálta dilatációját és hiperpermeabilitását. (Sawane 2011) Csoportunk legújabb vizsgálatai is arra utalnak, hogy ez a molekula lymphangiogén tulajdonsággal is rendelkezhet. Ezt támasztják alá azon eredményeink, amelyek szerint a humán nyirok endotél sejtek kifejezik az apelin receptorát mind mRNS (**22. ábra**), mind protein szinten (**23. ábra**). Az exogén apelin kezelés serkentette a humán nyirok endotél sejtek migrációját (**26. ábra**), a sejtek 3D-s tenyészeiben a képződő szferoidok számát (**25. ábra**), valamint endotél cső esszéiben a képződő csövek hosszát (**27. ábra**). Az apelin kezelés az UV sugárzás apoptózis indukáló hatását szignifikánsan csökkentette (**28. ábra**), továbbá serkentette az Erk és PI3K/Akt jelátviteli útvonalakat a nyirok endotél sejtekben (**29. ábra**). Az apelin-13

mellett egy másik apelin-származékkal, az F13A-val is végeztünk kísérleteket. Azt tapasztaltuk, hogy az F13A kismértékben fokozta a nyirok endotél sejtek migrációját (**26.A ábra**), szignifikánsan fokozta a sejtek érhalózat képződését (**27. ábra**), ugyanakkor apelin-13-mal együtt adva, annak motilitást serkentő hatását jelentősen csökkentette (**26.C ábra**). Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a tanulmánnyal, amely már arról számol be, hogy az F13A egy kompetitív agonistája az APJ receptornak (Macaluso 2011).

Vagyis vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az apelin molekula angiogén tulajdonsággal bír NSCLC-ben és mint prognosztikus faktor is szerepel, ugyanakkor a nyirokérképződésben is szerepet játszik. Így mint célzott terápiás célpont klinikai szempontból különösen érdekes lehet.

Munkám további részében a célzott terápiák egy másik lehetőségét vizsgáltam, amikor a célpont egy kismolekulával gátolható onkogén fehérje. A korábbiakban beszámoltam a mTOR molekula közvetítette jelátviteli útvonal jelentőségéről mind NSCLC, mind MPM esetében. Munkacsoportunk az mTOR gátlás lehetőségét vizsgálta temsirolimus által MPM esetében. Az MPM-ben szenvedő betegek esetében ugyanis a sebészet, radiológia és kemoterápia területén tett hatalmas erőfeszítések és új fejlesztések révén sem sikerült szignifikáns javulást elérni a túlélésben: az MPM továbbra is egy magas letalitású, növekvő incidenciájú megbetegedés. Így ennek a rosszindulatú megbetegedésnek a kezelésében is szükséges új terápiák fejlesztése.

Kísérleteimben azt vizsgáltam, hogy a temsirolimus hatása érvényesül-e nem-adherens szferoid MPM tenyészetekben is. Ehhez először tanulmányoztam humán mesothelioma sejtvonalak *in vitro* szferoidképző kapacitását (**30. ábra, 4. táblázat**). A szferoidok, ezek a határozott szerkezetű gömbszerű struktúrák, reprezentálják a daganat képződési folyamatot, elfogadva azt a nézetet, hogy ezek a tenyészetek „tumor össejtekben” gazdagodnak, amelyek megnövekedett tumor iniciáló képességgel rendelkeznek (Visvader 2008). Ezek a „tumor össejtek” felelősek lehetnek a szolid tumorok szisztémás terápiás rezisztenciájáért (Dean 2005). Az mTOR gátlás hatását ezen szferoidok növekedésére vizsgáltam, és azt tapasztaltam, hogy a temsirolimus kezelés csökkentette az MPM szferoidok számát és átmérőjét is (**31. ábra**). Több tanulmány is beszámol arról, hogy a humán MPM sejtek rezisztensek a kemoterápiás szerek indukálta apoptózissal szemben szferoid tenyészetekben (Kim 2005, Wilson

2008), amely terápiával szembeni hatástalanság legalábbis részben az mTOR hiperaktivációján alapul, ami interferál az apoptózis mitokondriális útvonalának aktivációjával (Barbone 2008). Összevetve eredményeinket ezekkel a megfigyelésekkel, feltételezhetjük, hogy az mTOR gátlásának nemcsak az MPM növekedésének gátlását kellene eredményezni a „tumor összejt kompartmentben”, de az intrinzik és/vagy szerzett kemoterápiával szembeni rezisztencia visszafordulását is.

A dolgozatban bemutatott saját eredményeimen kívül munkacsoportunk további vizsgálatai alapján azt találtuk, hogy az MPM tumorminták és sejtmodellek többségében megfigyelhető volt a fő szignál transzdukciós faktor, az mTOR foszforilációja. Saját eredményeink mellett mások is leírták már az mTOR hiperfoszforilációját MPM minták esetében (N=26) (Altomare 2005). A p-mTOR expressziója a mi kiterjesztett MPM klinikai mintasorozatunkban (N=70) inkább az epitheloid szövettani típusokban volt megfigyelhető (a sarcomatoid típusal összevetve). A bifázisos tumorokban az aktivált mTOR immunreaktivitás főként az epitheloid differenciációjú területekre korlátozódott. A mesothelioma mTOR aktivációja és szövettani altípusa közötti összefüggésről mások eddig még nem számoltak be.

Az epitheloid differenciáció mellett, az mTOR aktiváció különösen gyakran volt megfigyelhető a korai stádiumú megbetegedésekben, de negatívnak mutatkozott a nem-malignus szövetekben. Ez azt jelzi, hogy az mTOR aktivációja viszonylag korai onkogén esemény lehet az MPM progressziója során, ahogyan ezt már korai stádiumú tüdő adenocarcinoma esetében is leírták (Anagnostou 2009). Ezt a feltevést más tanulmányok is alátámasztják, amelyek szerint az mTOR-ig vezető jelút egyik upstream molekulája, az AKT aktivált azbeszt indukálta egér (Altomare 2005), illetve humán mesotheliomában (Cacciotti 2005).

További vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az mTOR gátlása temsirolimus-szal határozottan gyengítette az MPM sejtnövekedést *in vitro* és a tumor képződést *in vivo*. Megfigyeltük, hogy az mTOR gátlás különösen azon MPM sejteknél volt hatékony, amelyek belső vagy szerzett cisplatin rezisztenciával rendelkeztek. Ez azért lényeges, mert a cisplatin a jelen standard kombinációs kemoterápia komponense (Kaufman 2008). Továbbá azt is tapasztaltuk, hogy a temsirolimus szinergizált a cisplatinnal az MPM modellekben *in vitro* és *in vivo*. Ez összhangban van más tanulmányok eredményeivel. Hartman és munkatársai leírták, hogy a sirolimus molekula is serkenti a

cisplatin indukált sejthalált MPM sejtekben (Hartman 2010). Számos más daganattípus esetében is, mint amilyen a petefészekrák, endometriális tumorok, neuroektodermális daganatok és a tüdőrák (Bae-Jump 2009; Georger 2001; Mabuchi 2007; Wu 2005), az mTOR gátlók hatékony kemoszenzitizáló tulajdonságot mutattak a megnövelt cisplatin-indukált apoptózis által. Vizsgálatainkban a fokozott apoptózis indukció a cisplatin és temsirolimus közötti szinergizmus következménye. Az mTOR gátlás és a kemoterápia közötti szinergizmuson kívül azt találtuk, hogy a belső és szerzett cisplatin rezisztencia is velejárója az mTOR gátlással szembeni hiperszenzitivitásnak. Legjobb tudásunk szerint elsőként mutattuk ki, hogy az mTOR gátlás határozottan gyengíti a humán MPM xenograftok növekedését SCID egerekben *in vivo*. Mind a szignifikánsan redukált tumortömeg, mind a meghosszabodott túlélés megfigyelhető volt a masszív tumor nekrozis kísérőjelenségeként.

Összefoglalva tehát arra az eredményre jutottunk, hogy a temsirolimus hatékony a humán MPM-mel szemben *in vitro* és *in vivo*, hiperaktivitást mutat a cisplatin rezisztens MPM sejtekkel szemben, és szinergizál a platina alapú kemoterápiával. Ez felveti az mTOR gátlás további vizsgálatának szükségességét, mivel ígéretes kezelési stratégia lehet humán MPM esetén.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

1. A vizsgált NSCLC vonalak expresszálták az apelint és receptorát, ugyanakkor proliferációjukat nem befolyásolta az exogén apelin kezelés, illetve az apelin kódoló vektorral történő transzfekció.
2. Az apelint kifejező transzfektált sejtek subcutan tumorai szignifikánsan gyorsabban nőttek *in vivo*, és az intratumorális erek száma és átmérője is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest.
3. Humán NSCLC mintákban szignifikánsan megnőtt az apelin expressziójának mértéke a normál tüdőszövethez képest. A magas apelin-expresszió megnövekedett érdenzitással és rosszabb túléléssel párosult.
4. Eredményeink azt mutatják, hogy az apelin egy új angiogén faktor humán NSCLC-ben. Elsőként mutattunk ki kapcsolatot az apelin expresszió és egy humán daganattípus klinikai viselkedése között.
5. Humán nyirok endotél sejtek kifejezték az apelin receptorát. Exogén apelinrel történő kezelés nem befolyásolta a sejtek proliferációját *in vitro*, ugyanakkor szignifikánsan növelte migrációjukat, endotél cső esszében a képződő csövek átlagos hosszát, a sejtek 3D-s tenyészetében a szferoidok számát és szignifikánsan csökkentette az UV-besugárzás apoptózis indukáló hatását. Az exogén apelin kezelés aktiválta az Erk és a PI3K/Akt jelátviteli útvonalakat a nyirok endotél sejtekben. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az apelin lymphangiogén tulajdonsággal is rendelkezik.
6. Az MPM sejtvonalak 3D-s tenyészeiben az mTOR molekula temsirolimus-szal történő gátlása szignifikánsan csökkentette a szferoidok számát és átmérőjét, vagyis a temsirolimus kezelésnek hatása lehet az MPM sejtvonalak tumor iniciáló sejt kompartmentjére. Elsőként írtuk le, hogy az mTOR gátlás határozottan gyengíti humán MPM tumorok növekedését SCID egerekben, így az mTOR gátlás ígéretes új terápiás stratégia lehet MPM esetében.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi években a tumoros megbetegedések, így a mellkasi daganatok esetében is előtérbe kerültek a célzott terápiák. Ahhoz, hogy megfelelő molekuláris célpontot találjunk, elengedhetetlen a daganatok növekedéséért és beereződéséért felelős molekuláris háttér ismerete is. Ezért lényeges a különböző angiogén, lymphangiogén faktorok és onkogén fehérjék alapos tanulmányozása.

Munkánkban a közelmúltban felfedezett angiogén peptid, az apelin molekula lehetséges szerepét vizsgáltuk a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) beereződésében, valamint a nyirokérképződésben. A vizsgált NSCLC daganatminták és sejtvonalak kifejezték az apelint. Bár exogén apelin kezelés és apelin kódoló vektorral történt transzfecció nem befolyásolta a sejtvonalak proliferációját *in vitro*, az apelint kifejező transzfecciótolt sejtek subcutan tumorai szignifikánsan gyorsabban nőttek *in vivo*, és az intratumorális erek száma és átmérője is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest. A humán NSCLC mintákban a magas apelin koncentráció megnövekedett érdenzitással és rosszabb túléléssel párosult. Eredményeink azt mutatják, hogy az apelin egy új angiogén faktor humán NSCLC-ben. Elsőként mutattunk ki kapcsolatot az apelin expresszió és egy humán daganattípus klinikai viselkedése között. A következőkben az apelinerg rendszer lehetséges szerepét vizsgáltuk a nyirokérképződésben, annak *in vitro* modelljeivel. A humán nyirok endotél sejtek kifejezték az apelin receptorát. Migrációjukat, endotél csővé formálódásukat, 3-dimenziós tenyészetükben a képződő szferoidok számát, valamint az ERK és PI3K/Akt jelátviteli útvonalakat fokozta az exogén apelin kezelés. Ezen eredmények alapján arra jutottunk, hogy ez a molekula lymphangiogén tulajdonsággal is rendelkezhet.

A továbbiakban egy kismolekulával gátolható onkogén fehérje, az mTOR temsirolimus által történő gátlásának lehetőségét vizsgáltuk malignus pleurális mesothelioma (MPM) esetében. Azt találtuk, hogy a temsirolimus hatékony a humán MPM-mel szemben *in vitro* és *in vivo*.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az apelin mint lehetséges célpont szerepelhet a tumorok érhálózatára ható szerek fejlesztése során, ugyanakkor lymphangiogén tulajdonsága a nyirokrendszer zavaraihoz kapcsolódó betegségekben szenvedők számára is új terápiás szerek kifejlesztéséhez vezethet. Humán MPM esetében pedig az mTOR-inhibitor temsirolimus lehet ígéretes kezelési stratégia.

SUMMARY

Treatments with targeted molecular drugs have recently offered novel therapeutic strategies in the case of cancer, including thoracic tumors. The understanding of molecular mechanisms that underlie tumor growth and angiogenesis is essential to find appropriate molecular targets. Further efforts are, therefore, needed for the better knowledge of several angio- and lymphangiogenic molecules and oncogene proteins.

The aim of the study was to identify the potential role of the recently discovered bioactive peptide, apelin in the angiogenesis of non-small cell lung cancer (NSCLC) and in lymphangiogenesis. Apelin was expressed in the NSCLC samples and cell lines. Although exogenous apelin treatments and apelin overexpression did not increase NSCLC cell proliferation *in vitro*, increasing apelin levels by gene transfer to NSCLC cells significantly stimulated tumor growth and microvessel densities and perimeters *in vivo*. In human NSCLC samples, high apelin protein levels were associated with elevated microvessel densities and poor overall survival. Our results reveal apelin as a novel angiogenic factor in human NSCLC. Moreover, it also provides the first evidence for a direct association of apelin expression with clinical outcome in a human cancer. Then we examined the potential role of apelinerg system in lymphangiogenesis with *in vitro* models. We found that the apelin receptor was expressed by human lymphatic endothelial cells. Exogenous apelin treatment increased the migration, tube formation, the relative number of spheroids in three-dimensional culture of these cells and activated the ERK and PI3K/Akt signaling pathway. Based on our results, apelin can exert lymphangiogenic effects.

The oncogene protein, the mTOR molecule has been shown to be inhibited by the small molecule temsirolimus. We investigated the potential of mTOR inhibition by temsirolimus in malignant pleural mesothelioma (MPM) and found that the temsirolimus is active against human MPM *in vitro* and *in vivo*.

In summary, we present in this study that apelin can be a potential target for the development of novel agents targeting the tumor vasculature. In addition, the demonstration of lymphangiogenic potential of apelin is especially intriguing, as translation of such an effect to the clinical setting could potentially offer therapeutic

benefits to patients with various lymphatic diseases. In the case of MPM our data suggest that mTOR inhibition by temsirolimus is a promising novel therapeutic strategy.

9 IRODALOMJEGYZÉK

Albrecht I, Christofori G (2011) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol*, 55(4-5):483-94.

Altomare DA, You H, Xiao GH, Ramos-Nino ME, Skele KL, De Rienzo A, Jhanwar SC, Mossman BT, Kane AB, Testa JR (2005) Human and mouse mesotheliomas exhibit elevated AKT/PKB activity, which can be targeted pharmacologically to inhibit tumor cell growth. *Oncogene*, 24(40):6080-9.

Ameri K, Luong R, Zhang H, Powell AA, Montgomery KD, Espinosa I, Bouley DM, Harris AL, Jeffrey SS (2010) Circulating tumour cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype. *Br J Cancer*, 102(3):561-9.

Amir E, Hughes S, Blackhall F, Thatcher N, Ostoros G, Timar J, Tovari J, Kovacs G, Dome B (2008) Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(5):392-403.

Amir E, Mandoky L, Blackhall F, Thatcher N, Klepetko W, Ankersmit HJ, Reza Hoda MA, Ostoros G, Dank M, Dome B (2009) Antivascular agents for non-small-cell lung cancer: current status and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*, 18(11):1667-86.

Anagnostou VK, Bepler G, Syrigos KN, Tanoue L, Gettinger S, Homer RJ, Boffa D, Detterbeck F, Rimm DL (2009) High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 15(12):4157-64.

A study of ABT-751 in patients with NSCLC. (2009) Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00073151?cond=nsclc&intr=abt+751&rank=3>

A study to assess the effectiveness of the combination of carboplatin, paclitaxel, bevacizumab and combretastatin (CA4P) in patients with chemotherapy naïve lung cancer. (2009) Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00653939?cond=nsclc&intr=ca4p&rank=1>

Attané C, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prévot D, Carpené C, Castan-Laurell I, Valet P (2011) Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue *ex vivo*. *J Mol Endocrinol*, 46(1):21-8.

Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF, Gehrig PA (2009) Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells. *Cancer*, 115(17):3887-96.

Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG.(2005) Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 25(6):2441-9.

Balsara BR, Pei J, Mitsuuchi Y, Page R, Klein-Szanto A, Wang H, Unger M, Testa JR (2004) Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis*, 25(11):2053-9.

Barbone D, Yang TM, Morgan JR, Gaudino G, Broaddus VC (2008) Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem*, 283(19):13021-30.

Beltowski J (2006) Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit*, 12(6):RA112-9.

Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J, Lane HA, Thomas G (2005) The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell*, 120(6):747-59.

Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpené C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 146(4):1764-71.

Bremnes RM, Camps C, Sirera R (2006) Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer*, 51(2):143-58.

Buckner JC, Forouzesh B, Erlichman C, Hidalgo M, Boni JP, Dukart G, Berkenblit A, Rowinsky EK (2010) Phase I, pharmacokinetic study of temsirolimus administered orally to patients with advanced cancer. *Invest New Drugs*, 28(3):334-42.

Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME (2004) ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab*, 15(4):166-9.

Byzova TV, Goldman CK, Jankau J, Chen J, Cabrera G, Achen MG, Stacker SA, Carnevale KA, Siemionow M, Deitcher SR, DiCorleto PE (2002) Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns *in vivo*. *Blood*, 99(12):4434-42.

Cacciotti P, Barbone D, Porta C, Altomare DA, Testa JR, Mutti L, Gaudino G (2005) SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure. *Cancer Res*, 65(12):5256-62.

Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, Daviaud D, Guigné C, Valet P (2005) Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol*, 245(1-2):7-9.

Cheng X, Cheng XS, Pang CC (2003) Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, 470(3):171-5.

Ciuffreda L, Di Sanza C, Incani UC, Milella M (2010) The mTOR pathway: a new target in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 10(5):484-95

Coulson JM, Ocejo-Garcia M, Woll PJ (2003) Neuroendocrine phenotype of small cell lung cancer. *Methods Mol Med*, 74:61-73.

Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA (2006) Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol*, 296(1):177-89.

Dean M, Fojo T, Bates S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5(4):275-84.

De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortès C (2000) Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology*, 72(6):400-7.

Devic E, Rizzoti K, Bodin S, Knibiehler B, Audigier Y (1999) Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev*, 84(1-2):199-203.

Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170(1):1-15.

Döme B, Magyar M (2008) [Tumor vasculature as a therapeutic target in non-small cell lung cancer]. [Article in Hungarian] *Magy Onkol*, 52(3):247-59.

Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F (2008) Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*, 103(4):432-40.

Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*, 5(8):671-88.

Falcão-Pires I, Ladeiras-Lopes R, Leite-Moreira AF (2010) The apelinergic system: a promising therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, 14(6):633-45.

Földes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sárman B, Seres L, Skoumal R, Lakó-Futó Z, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M (2003) Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(3):480-5.

Gaughan EM, Costa DB (2011) Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: focus on EGFR, KRAS and ALK gene abnormalities. *Ther Adv Med Oncol*, 3(3):113-25.

Geoerger B, Kerr K, Tang CB, Fung KM, Powell B, Sutton LN, Phillips PC, Janss AJ (2001) Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res*, 61(4):1527-32.

Giaccone G. (2007) The potential of antiangiogenic therapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13(7):1961-70.

Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, Spitznagel EL, Piccirillo J (2006) Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*, 24(28):4539-44.

Gröger M, Loewe R, Holnthoner W, Embacher R, Pillinger M, Herron GS, Wolff K, Petzelbauer P (2004) IL-3 induces expression of lymphatic markers Prox-1 and podoplanin in human endothelial cells. *J Immunol*, 173(12):7161-9.

Gyula O, András B, Zoltán B, Katalin B, Attila C, Janos F, Maria G, Akos H, László K, László K, Gabor K, György L, Judit M, Tamas MF, Zsuzsa M, Pál R, Zsolt O, János S, Zoltán S, István S, Klára S, Jozsef T, Edina T; NEFMI - Nemzeti Erőforrás Minisztérium [Department of Human Resources] (2012) [Basic principles for the prevention, diagnosis and therapy of lung cancer]. [Article in Hungarian] *Magy Onkol*, 56(2):114-32.

Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M. (1999) Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta*, 1452(1):25-35.

Han S, Wang G, Qiu S, de la Motte C, Wang HQ, Gomez G, Englander EW, Greeley GH Jr (2007) Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regul Pept*, 142(3):131-7.

Hartman ML, Esposito JM, Yeap BY, Sugarbaker DJ (2010) Combined treatment with cisplatin and sirolimus to enhance cell death in human mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 139(5):1233-40.

Hegedüs B, Czirók A, Fazekas I, B'abel T, Madar'asz E, Vicsek T (2000). Locomotion and proliferation of glioblastoma cells *in vitro*: statistical evaluation of videomicroscopic observations. *J Neurosurg*, 92(3): 428-34.

Hegedus B, Zách J, Czirók A, Lövey J, Vicsek T (2004). Irradiation and Taxol treatment result in non-monotonous, dose-dependent changes in the motility of glioblastoma cells. *J Neurooncol*, 67(1-2): 147-57.

Heo K, Kim YH, Sung HJ, Li HY, Yoo CW, Kim JY, Park JY, Lee UL, Nam BH, Kim EO, Kim SY, Lee SH, Park JB, Choi SW (2012) Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*, 48(6):500-6.

Hosking B, Makinen T (2007) Lymphatic vasculature: a molecular perspective. *Bioessays*, 29(12):1192-202..

Hu PF, Chen WP, Tang JL, Bao JP, Wu LD (2010) Apelin plays a catabolic role on articular cartilage: *in vivo* and *in vitro* studies. *Int J Mol Med*, 26(3):357-63.

Jackman DM (2009) Current options for systemic therapy in mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 21(2):154-8.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2):69-90.

Ji RC (2006) Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol*, 4(2):83-100.

Kälin RE, Kretz MP, Meyer AM, Kispert A, Heppner FL, Brändli AW (2007) Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol*, 305(2):599-614.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 5(1):74-80.

Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res*, 61(5):1786-90.

Karpanen T, Alitalo K (2008) Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*, 3:367-97

Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A (2004) Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 325(2):395-400.

Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, Hashimoto H, Kakuda M, Tano Y, Baba A (2008) Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(10):1717-22.

Kaufman AJ, Pass HI (2008) Current concepts in malignant pleural mesothelioma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8(2):293-303.

Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta*, 1538(2-3):162-71.

Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N (2008) Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*, 27(3):522-34.

Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N (2012 Jul) The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*, 31(27):3254-64.

Kidoya H, Takakura N (2012 Aug) Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *J Biochem*, 152(2):125-31.

Kim KU, Wilson SM, Abayasiriwardana KS, Collins R, Fjellbirkeland L, Xu Z, Jablons DM, Nishimura SL, Broaddus VC (2005) A novel *in vitro* model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33(6):541-8.

Kleinz MJ, Davenport AP (2004) Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept*, 118(3):119-25.

Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP (2005) Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept*, 126(3):233-40.

Kurie JM, Shin HJ, Lee JS, Morice RC, Ro JY, Lippman SM, Hittelman WN, Yu R, Lee JJ, Hong WK (1996) Increased epidermal growth factor receptor expression in metaplastic bronchial epithelium. *Clin Cancer Res*, 2(10):1787-93.

Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF (2008) The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq Bras Cardiol*, 90(5):343-9.

Lanphear BP, Buncher CR (1992) Latent period for malignant mesothelioma of occupational origin. *J Occup Med*, 34(7):718-21.

Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH (1995) Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--an analysis of 1,714 consecutive patients. *J Clin Oncol*, 13(5):1215-20.

Lee DK, Lança AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F Jr, Chemtob S, George SR, O'Dowd BF (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem*, 279(9):7901-8.

Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF (2005) Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology*, 146(1):231-6.

Liu C, Su T, Li F, Li L, Qin X, Pan W, Feng F, Chen F, Liao D, Chen L (2010) PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(6):396-402.

Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF, Testa JR (2007) RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res*, 13(14):4261-70.

Macaluso NJ, Pitkin SL, Maguire JJ, Davenport AP, Glen RC (2011) Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist. *ChemMedChem*, 6(6):1017-23.

Maloney PR, Khan P, Hedrick M, Gosalia P, Milewski M, Li L, Roth GP, Sergienko E, Suyama E, Sugarman E, Nguyen K, Mehta A, Vasile S, Su Y, Stonich D, Nguyen H, Zeng FY, Novo AM, Vicchiarelli M, Diwan J, Chung TD, Smith LH, Pinkerton AB (2012) Discovery of 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoate (ML221) as a functional antagonist of the apelin (APJ) receptor. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(21):6656-60.

Marinov M, Fischer B, Arcaro A (2007) Targeting mTOR signaling in lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 63(2):172-82.

Masri B, Knibiehler B, Audigier Y (2004) Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal*, 17(4):415-26.

Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y (2004) Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J*, 18(15):1909-11.

Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y (2002) Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1):539-45.

Masri B, Morin N, Pedebernade L, Knibiehler B, Audigier Y (2006) The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J Biol Chem*, 281(27):18317-26.

McKeage MJ, Von Pawel J, Reck M, Jameson MB, Rosenthal MA, Sullivan R, Gibbs D, Mainwaring PN, Serke M, Lafitte JJ, Chouaid C, Freitag L, Quoix E (2008) Randomised phase II study of ASA404 combined with carboplatin and paclitaxel in previously untreated advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 99(12):2006-12.

Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem*, 84(5):1162-72.

Mita MM, Mita A, Rowinsky EK (2003) The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther*, 2(4 Suppl 1):S169-77.

Moldvay J (2012) Personalized therapy in non-small cell lung cancer: from diagnosis to therapy. *Orv Hetil*, 153(23):909-16.

Morabito A, Piccirillo MC, Falasconi F, De Feo G, Del Giudice A, Bryce J, Di Maio M, De Maio E, Normanno N, Perrone F (2009) Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions. *Oncologist*, 14(4):378-90.

Mountain FC (1997) Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 111:1710-1717.

Mumprecht V, Detmar M (2009) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *J Cell Mol Med*, 13(8A):1405-16.

Nogová L, Boellaard R, Kobe C, Hoetjes N, Zander T, Gross SH, Dimitrijevic S, Pellas T, Eschner W, Schmidt K, Bangard C, Hayes W, Thomas RK, Dietlein M, Giaccone G, Hoekstra OS, Lammertsma AA, Wolf J (2009) Downregulation of 18F-FDG uptake in PET as an early pharmacodynamic effect in treatment of non-small cell lung cancer with the mTOR inhibitor everolimus. *J Nucl Med*, 50(11):1815-9.

Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J (1997) VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol*, 188(1):96-109.

O'Shea M, Hansen MJ, Tatemoto K, Morris MJ (2003) Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci*, 6(3):163-7.

Paku S, Kopper L, Nagy P (2005) Development of the vasculature in "pushing-type" liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer*, 115(6):893-902.

Pao W, Hutchinson KE (2012) Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med*, 18(3):349-51.

Papadimitrakopoulou VA, Soria JC, Jappe A, Jehl V, Klimovsky J, Johnson BE (2012) Everolimus and erlotinib as second- or third-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Thorac Oncol*, 7(10):1594-601.

Pass HI (2001) Malignant pleural mesothelioma: surgical roles and novel therapies. *Clin Lung Cancer*, 3(2):102-17.

Pennell NA, Lynch TJ Jr (2009) Combined inhibition of the VEGFR and EGFR signaling pathways in the treatment of NSCLC. *Oncologist*, 14(4):399-411

Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E (1999) The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer*, 79(3-4):666-72.

Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S Jr, Olak J, Stover D, Strawn JR, Turrisi AT, Somerfield MR; American Society of Clinical Oncology (2004) American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol*, 22(2):330-53.

Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V, Jiménez W (2008) The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology*, 48(4):1193-201.

Rayalam S, Della-Fera MA, Krieg PA, Cox CM, Robins A, Baile CA (2008) A putative role for apelin in the etiology of obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 368(3):815-9.

Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortès C (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem*, 77(4):1085-96.

Reungwetwattana T, Molina JR, Mandrekar SJ, Allen-Ziegler K, Rowland KM, Reuter NF, Luyun RF, Dy GK, Marks RS, Schild SE, Jett JR, Adjei AA (2012) Brief report: a phase II "window-of-opportunity" frontline study of the mTOR inhibitor, temsirolimus given as a single agent in patients with advanced NSCLC, an NCCTG study. *J Thorac Oncol*, 7(5):919-22.

Rini BI (2008) Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. *Clin Cancer Res*, 14(5):1286-90.

Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA (2010) Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol*, 28(31):4769-77.

Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K (2004) Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol*, 25(7):387-95.

Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B, Audigier Y (2002) Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev*, 110(1-2):183-6.

Sawane M, Kidoya H, Muramatsu F, Takakura N, Kajiya K (2011) Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. *Am J Pathol*, 179(6):2691-7.

Scherpereel A, Astoul P, Baas P, Berghmans T, Clayson H, de Vuyst P, Dienemann H, Galateau-Salle F, Hennequin C, Hillerdal G, Le Péchoux C, Mutti L, Pairon JC, Stahel R, van Houtte P, van Meerbeeck J, Waller D, Weder W; European Respiratory Society/European Society of Thoracic Surgeons Task Force (2010) Guidelines of the

European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J*, 35(3):479-95.

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH; Eastern Cooperative Oncology Group (2002) Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 346(2):92-8.

Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV (2011) Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*, 193(4):607-18.

Sekido Y (2010) Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci*, 101(1):1-6.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(3):169-81.

Soltani Hekmat A, Najafipour H, Nekooian AA, Esmaeli-Mahani S, Javanmardi K (2011) Cardiovascular responses to apelin in two-kidney-one-clip hypertensive rats and its receptor expression in ischemic and non-ischemic kidneys. *Regul Pept*, 172(1-3):62-8.

Sorli SC, van den Berghe L, Masri B, Knibiehler B, Audigier Y (2006) Therapeutic potential of interfering with apelin signalling. *Drug Discov Today*, 11(23-24):1100-6.

Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y (2007) Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*, 26(55):7692-9.

Spugnini EP, Bosari S, Citro G, Lorenzon I, Cognetti F, Baldi A (2006) Human malignant mesothelioma: molecular mechanisms of pathogenesis and progression. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(12):2000-4.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*, 7(2):186-91.

Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML (2007) The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer*, 96(4):541-5.

Sugarbaker DJ, Garcia JP, Richards WG, Harpole DH Jr, Healy-Baldini E, DeCamp MM Jr, Mentzer SJ, Liptay MJ, Strauss GM, Swanson SJ (1996) Extrapleural pneumonectomy in the multimodality therapy of malignant pleural mesothelioma. Results in 120 consecutive patients. *Ann Surg*, 224(3):288-94; discussion 294-6.

Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett*, 353(1):1-4.

Suzuki Y, Murakami H, Kawaguchi K, Tanigushi T, Fujii M, Shinjo K, Kondo Y, Osada H, Shimokata K, Horio Y, Hasegawa Y, Hida T, Sekido Y (2009) Activation of the PI3K-AKT pathway in human malignant mesothelioma cells. *Mol Med Report*, 2(2):181-8.

Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piihola J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*, 91(5):434-40.

Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S (2002) The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(5):1208-12.

Takakura N, Kidoya H (2009) Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells: involvement of apelin/APJ and angiopoietin/Tie2 interactions in vessel caliber size regulation. *Thromb Haemost*, 101(6):999-1005.

Tammela T, Alitalo K (2010) Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*, 140(4):460-76.

Tang SY, Xie H, Yuan LQ, Luo XH, Huang J, Cui RR, Zhou HD, Wu XP, Liao EY (2007) Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3K/Akt signaling pathways. *Peptides*, 28(3):708-18.

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 251(2):471-6.

Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*, 99(2-3):87-92.

Tiani C, Garcia-Pras E, Mejias M, de Gottardi A, Berzigotti A, Bosch J, Fernandez M (2009) Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J Hepatol*, 50(2):296-305.

Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda MA, Ghanim B, Berger W, Klepetko W, Dome B, Ostoros G (2011) Lung cancer in never smokers. *Future Oncol*, 7(10):1195-211.

Tóvári J, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó A, Tímár J (2005) Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res*, 65(16):7186-93.

Visvader JE, Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8(10):755-68.

Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P (2003) Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*, 15;21(14):2636-44.

Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, OCarroll AM, Mochizuki T, Wang HQ, Hellmich MR, Englander EW, Greeley GH Jr (2004) Apelin, a new enteric peptide: localization in the

gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology*, 145(3):1342-8.

Wang Z, Greeley GH Jr, Qiu S (2008) Immunohistochemical localization of apelin in human normal breast and breast carcinoma. *J Mol Histol*, 39(1):121-4.

Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN (1982) The mesothelium and its reactions: a review. *Crit Rev Toxicol*, 10(2):81-144.

Wilson SM, Barbone D, Yang TM, Jablons DM, Bueno R, Sugarbaker DJ, Nishimura SL, Gordon GJ, Broaddus VC (2008) mTOR mediates survival signals in malignant mesothelioma grown as tumor fragment spheroids. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39(5):576-83.

Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, Kuo MT, Robles C, Lampidis T, Savaraj N (2005) Overcoming cisplatin resistance by mTOR inhibitor in lung cancer. *Mol Cancer*, 4(1):25

Xie H, Tang SY, Cui RR, Huang J, Ren XH, Yuan LQ, Lu Y, Yang M, Zhou HD, Wu XP, Luo XH, Liao EY (2006) Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul Pept*, 134(2-3):118-25.

Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, Bubici C, Mossman BT, Pass HI, Testa JR, Franzoso G, Carbone M (2006) TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(27):10397-402

Yang H, Testa JR, Carbone M (2008) Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol*, 9(2-3):147-57.

Yue P, Jin H, Xu S, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS (2011) Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology*, 152(1):59-68.

Zeng X, Yu SP, Taylor T, Ogle M, Wei L (2011) Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis. *Stem Cell Res*, 8(3):357-367.

Zhou N, Fang J, Acheampong E, Mukhtar M, Pomerantz RJ (2003) Binding of ALX40-4C to APJ, a CNS-based receptor, inhibits its utilization as a co-receptor by HIV-1. *Virology*, 312(1):196-203.

Zhou N, Zhang X, Fan X, Argyris E, Fang J, Acheampong E, DuBois GC, Pomerantz RJ (2003) The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology*; 317(1):84-94.

Zucali PA, Giaccone G (2006) Biology and management of malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cancer*, 42(16):2706-14.

10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **Berta J**, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: Role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol.* 2010 Aug;5(8):1120-9. IF: 3.661
2. Hoda MA, Mohamed A, Ghanim B, Filipits M, Hegedus B, Tamura M, **Berta J**, Kubista B, Dome B, Grusch M, Setinek U, Micksche M, Klepetko W, Berger W. Temsirolimus Inhibits Malignant Pleural Mesothelioma Growth *in vitro* and *in vivo*: Synergism with Chemotherapy. *J Thorac Oncol.* 2011 May;6(5):852-63. IF: 4.040

Disszertációtól független közlemények:

1. Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, **Berta J**, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Döme B, Klepetko W, Tímár J, Tóvári J. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 May;10(3):332-42. IF: 4.771
2. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, **Berta J**, Milch H, Füzi M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):978-85. IF: 4.328

11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Döme Balázsnak és Dr. Hegedűs Balázsnak, hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérték, és mind az elméleti, mind a gyakorlati kérdésekben hasznos tanácsokkal láttak el, s a dolgozatom összeállításában is segítségemre voltak.

Köszönetet mondok az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet volt vezetőjének, Dr. Strausz Jánosnak, és jelenlegi vezetőjének, Dr. Kovács Gábornak, hogy hozzájárultak ahhoz, hogy kutató tevékenységemet ebben az intézményben folytathassam. Köszönöm Dr. Barta Imre értekezésemmel kapcsolatban adott házi opponensi tanácsait. Hálás vagyok a támogatásért Dr. Ostoros Gyulának és Dr. Bogos Krisztinának.

Köszönöm az OKTPI Tumorbiológiai Osztály valamennyi munkatársának, Keszthelyi Magdolnának, Rózsás Anitának, Török Szilviának, Cserepes T. Mihálynak és Albitz Piroskának, valamint az Országos Onkológiai Intézet, Sebészi és Molekuláris Daganatpatológiai Centrum Tumorbiológiai Osztálya több jelenlegi illetve régebbi munkatársának: Dr. Tóvári Józsefnek, Dr. Ladányi Andreának, Dr. Dobos Juditnak, Parragné Derecskei Katalinnak és Sinka Andrásnének, hogy mindig segítségemre voltak. Köszönöm a támogatását a Semmelweis Egyetem, II. számú Patológiai Intézet vezetőjének, Prof. Tímár Józsefnek. Köszönöm továbbá a segítségét a II. sz. Patológiai Intézet munkatársainak, Dr. Kenessey Istvánnak és Garay Tamásnak.

Köszönetet mondok a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkassebészeti Klinika vezetőjének, Prof. Walter Klepetkonak és a Rákkutató Intézet vezetőjének, Prof. Walter Bergernek, hogy kutató laboratóriumukban lehetőséget adtak kísérleteim elvégzésére. Szeretném megköszönni az Ernst Mach grant, az EACR ösztöndíj, valamint a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj adományozóinak osztrák tanulmányutam anyagi támogatását. Valamint köszönöm segítő támogatását a bécsi labor több munkatársának: Dr. László Viktóriának, Dr. Thomas Klikovitsnak, Dr. Mir Alireza Hodának, Dr. Bahil Ghanimnak és Andreas Wagnernek.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy hosszú éveken át megteremtették a tudományos tevékenységemhez szükséges háttérrel, és mellettem álltak minden probléma leküzdésében.