

# Humán daganatsejtek migrációjának és proliferációjának onkogén-függő szabályozása

Doktori tézisek

**Garay M. Tamás**

Semmelweis Egyetem  
Patológia Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hegedűs Balázs

Hivatalos bírálók:

Dr. Kőhidai László

Dr. Ayaydin Ferhan

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Sréter Lídia

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sarkadi Balázs

Dr. Herszényi László

Budapest  
2013

## BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések előfordulási gyakorisága folyamatos növekedést mutat. Az esetek többségében nem az elsődleges daganat, hanem a távoli áttétek kialakulása miatt végzetes a betegség. Az áttétek kialakulása összetett folyamat, amelyhez szükséges a sejtek adhéziójának, osztódásának és mozgásának időbeli és térbeli összehangolása. Eme biológiai folyamatok kapcsolata intenzíven tanulmányozott terület. Bizonyos kísérleti adatokon, valamint azon feltételezésnek megfelelően, hogy a sejtvezeték nem vehet részt egy időben a sejtmozgás és osztódás folyamataiban, a “go or grow” hipotézis posztulálja, hogy a sejt migráció és proliferáció egymást kizáró folyamatok és a tumor sejtek késleltetik az osztódást a migráció érdekében. A “go or grow” hipotézis szinte valamennyi kísérletes és elméleti vizsgálata neuroektodermális eredetű intrakraniális tumorsejteken zajlott, a kapott eredmények azonban korántsem egyértelműek. Gliómák esetében számos molekuláris mechanizmust is leírtak, amelyek meghatározhatják, hogy a sejt mozogni vagy osztódni fog-e: ilyenek a FAK kifejeződése és aktivitása, a mir451/ LKB1/AMPK vagy a mir9/CREB/NF1 szabályozás valamint a karboxipeptidáz E (CPE) expressziója.

A “go or grow” hipotézis alapján különösen fontos lenne olyan hatékony rákellenes szerek kifejlesztése, melyek azokat a túlélő tumorsejt alpopulációkat vehetik célba, melyek képesek elvándorolni az elsődleges tumorból és fennmaradni az áttét célszervének eltérő környezetében. Ha a tumorsejtek valóban késleltetik a proliferációt a migráció érdekében, akkor a vándorló tumorsejtek kisebb érzékenységet mutathatnak azokkal a kezelésekkel szemben, melyek a proliferációt gátolják. A proliferációt gátló terápiák alkalmazás során kiválogatódhatnak nagyobb migrációs képességű sejtek, valamint fokozódhat a sejtmozgás a túlélő sejtpopulációkban.

Ugyanakkor a migráció gátlása osztódást indukálhat a vándorló sejtekben, ami az elsődleges vagy másodlagos tumor növekedéséhez vezethet. Ezen okok miatt a sejtsztódás és sejtmozgás közötti kapcsolat mélyebb megismerése elengedhetetlen a mindkét folyamatot gátló terápiák kifejlesztéséhez. Mivel a “go or grow” hipotézis vizsgálata eddig elsősorban agytumorsejteken történt, mi olyan sejt kultúrák videomikroszkópos mérését végeztük el, melyek között neuroektodermális, mezodermális és entodermális eredetűek is voltak.

A napjainkban elérhető különböző rákellenes terápiák a proliferáció és migráció gátlásához gyakran veszik célba a különböző növekedési faktor (GF) vagy a TGF jelátviteli útvonalakat. Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptora az EGFR, míg a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (FGF2) mind a négy FGFR-t képes aktiválni. Eme jelátviteli útvonalak nagymértékben átfednek, például a Ras és Raf fehérjék mind az EGF mind az FGF2 szignalizációban központi szerepet játszanak. Rendellenes EGFR és FGFR jelátvitel számos daganattípusban megfigyelhető, melanóma esetében mindkét ligand tumorserkentő hatását bizonyították. Az EGFR és FGFR jelátvitelt az onkogén NRAS (10-30%) és BRAF (40-70%) mutációk is befolyásolják. Az EGFR/FGFR szignalizáció gátlása megvalósítható a receptorok (monoklonális antitestek, receptor tirozin kináz inhibitorok) valamint a jelátvitel alsóbb szintjein is. A sejten belüli jelátvitel gátlás egyik jelenleg is kutatott területe a zoledronsavval történő kezelés, amely a Ras egyik fehérjeszintézis utáni módosítását, a prenilációt gátolja. Mivel az EGF és az FGF2 nagyban átfedő jelátviteli hálózaton hatnak valamint az melanómában található onkogén mutációk legnagyobb része ezeket érinti, munkánk során az EGF és FGF2 szignalizáció aktivációjára és gátlására adott választ vizsgáltuk különböző NRAS és BRAF mutációt hordozó melanóma sejtekben.

Az aktivin fehérje a TGF $\beta$  jelátviteli rendszer egyik eleme. Egy dimer fehérje, amely számos úgynevezett I-es és II-es típusú receptor aktiválására képes. Daganatokban az aktivin szignalizáció a sejtosztódás és tumorprogresszió fokozására és gátlására is képes lehet. Májkarcinómák, emlő és prosztata daganatok esetében az aktivin jelátvitel a proliferációra és tumorprogresszióra gátló hatást fejt ki. Ezzel szemben endometriális karcinóma, szájüregi laphám karcinóma, here és gyomor daganatok valamint mellüregi daganatok (nyelőcső laphámrák és adenokarcinóma, tüdő adenokarcinóma) esetében az aktivin szignalizáció elősegíti a proliferációt. Az egyik exogén antagonistája, amely az aktivin mindhárom I-es típusú receptorán hat az SB-431542 molekula. Mivel az aktivin daganatserkentő hatással bír számos mellüregi daganatban valamint a malignus pleurális mezotelióma ellen nem létezik még célzott terápia, kísérleteink célja volt az aktivin szignalizáció gátlásának vizsgálata humán mezotelióma sejteken.

Összefoglalva, humán tumorsejtekben a növekedési receptor jelátviteli útvonal és az útvonalban található onkogén mutációk a fontos meghatározói a sejtmozgás és osztódás közötti egyensúlynak. PhD disszertációmban ennek megfelelően az alábbi tudományos kérdésekre kerestük a választ.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. *A “go or grow” hipotézis alapján a humán daganat sejtek késleltetik-e a proliferációt a sejtmozgás érdekében?* Kísérleteink során 35 tüdődaganat, melanóma és mezotelióma sejtvonal proliferációját, migrációját és citokinézis időtartamát mértük meg videomikroszkópos vizsgálatok segítségével, majd korrelációs analízist végeztünk eme folyamatok között mind egyedi sejt, mind populációs szinten.
2. *Szükséges-e a multicelluláris szferoidokból az extracelluláris mátrixba történő invázióhoz a sejtek egyidejű proliferációja?* Azért tettük fel ezt a kérdést, mivel számos matematikai modellben a tumorsejtek 3D inváziójának egyik előfeltételének tartják a proliferációt, habár erre a feltételezésre vonatkozóan nincsenek kísérletes megfigyelések. Ennek tisztázására tumorsejtek multicelluláris szferoidokjainak kollagén gélben kialakuló inváziós mintázatát vizsgáltuk proliferációt megengedő és nem megengedő körülmények között.
3. *A BRAF és NRAS onkogén mutációk meghatározzák-e a melanóma sejtek migrációs és proliferációs válaszát az EGFR és FGFR aktivációjára illetve gátlására?* Először meghatároztuk számos melanóma sejtvonal BRAF és NRAS onkogén mutációját, valamint az EGFR és FGFR kifejeződésének mértékét, majd az EGF és FGF2 valamint az EGFR és FGFR inhibitorok migrációra, proliferációra és jelátvitelre gyakorolt hatását vizsgáltuk.
4. *A preniláció gátlása hatással van-e a migrációra, proliferációra és a Ras jelátvitel aktivitására humán melanóma sejteken in vitro és in vivo?* Kísérletünkben a zoledronsav kezelés BRAF és az NRAS mutáció függő hatását vizsgáltuk migrációra, proliferációra és apoptózisra *in vitro* körülmények között. Továbbá a

zoledronsav elsődleges tumornövekedésre és az áttétképzési képességre gyakorolt hatását is vizsgáltuk különböző mutációkat hordozó melanóma sejtekkel injektált állatmodelleken.

5. *Az aktivin szignalizáció serkentő vagy gátló hatással bír-e a migrációra és a proliferációra humán mezotelióma sejteken?* Videomikroszkópos módszerrel vizsgáltuk az aktivin és az SB431542 nevű aktivin receptor gátlószer hatását humán mezotelióma sejtek proliferációjára, citokinézisére és migrációjára.

## **MÓDSZEREK**

### **Sejtvonalak**

Tizenhárom melanóma, tizenkét mezotelióma, tíz tüdődaganat és két agytumor eredetű sejtvonalat használtunk kísérleteink során.

### **Vegyületek/gátlószerek**

A következő vegyületeket használtuk fel a kísérletekben: EGF; FGF2; FGFR-gátlók: ponatinib, BGJ-398, BIBF-1120, AZD-4547; EGFR-gátlók: gefitinib, erlotinib, CI-1033, pelitinib; a preniláció-gátló zoledronsav (ZA); aktivin és az aktivin-receptor inhibitor SB-431542.

### **Videomikroszkóp**

A sejtek proliferációjának és migrációjának és a citokinézis időtartamának mérését sejtkultúrákról készült fáziskontraszt mikroszkóppal készített felvételek alapján végeztük el.

### **Kollagén inváziós esszé**

Gliómasejtek pelletéből készített szferoidokat ágyasztunk be kollagén gélbe, majd felvételeket készítettünk az inváziós mintázatról és megmértük a sejtek eltávolódását.

### **Mutációs analízis**

Melanóma sejtekből kivont genomikus DNS-ből BRAF és NRAS mutációs analízist végeztünk mikrokapillaris restrikciós fragment-hossz analízis és direkt DNS szekvenálás segítségével.

### **Kvantitatív PCR**

Totál RNS izolálást követően reverz transzkripciót végeztünk, majd kvantitatív valós idejű PCR segítségével meghatároztuk az EGFR és FGFR expresszióját melanóma sejtvonalakban.

### **Sejt-életképesség meghatározása**

A letapadó sejt kultúrákat kezelés után triklórecetsavval fixáltuk. A teljes fehérje mennyiséget SRB festés segítségével kolorimetrikusan meghatároztuk, majd a kapott adatokból következtettünk a sejtek életképességére.

### **Apoptózis kimutatása**

Zoledronsav kezelést követően a programozott sejthalál gyakoriságát vizsgáltuk paraformaldehid fixált sejteken végzett TUNEL festés segítségével és megszámláltuk a TUNEL pozitív sejteket.

### **A jelátviteli aktiváció mérése**

Az Erk1/2, S6, FAK és Src fehérjék aktivációját foszforilációs immunoblot analízissel határoztuk meg humán melanóma sejt vonalakon.

### ***In vivo* szubkután xenograft modell**

A zoledronsav hatásának elsődleges tumorokon történő vizsgálatához humán melanóma sejteket injektáltunk bőr alá NSG egerek hátába, majd heti intraperitoneális kezeléseket követően a tumor térfogatát meghatároztuk.

### ***In vivo* lép-máj kolonizációs vizsgálat**

A zoledronsav áttétképzésre gyakorolt hatásának vizsgálatához lépből májba történő kolonizációs kísérletet hajtottunk végre NSG egereken. Az állatokat intraperitoneálisan kezeltük három hétig, majd a lépét és a májat eltávolítottuk és megmértük.

### **Statisztikai analízis**

Minden statisztikai analízist GraphPad Prism 5 programmal végeztünk el.



## EREDMÉNYEK

### **A sejtmozgás és osztódás összefüggése sejt kultúrákban**

A migráció és proliferáció, illetve ezek kölcsönhatása – amire a „go or grow” hipotézis is vonatkozik – rendkívül fontos szerepet játszik a daganatok progressziójában. A hipotézis érvényességét vizsgáló korábbi kutatások a központi idegrendszer daganatain folytak. Vizsgálatainkat neuroektodermális, mezodermális és entodermális eredetű sejt vonalakra egyaránt kiterjesztettük. Videomikroszkópos felvételek elemzésével vizsgáltuk a migrációt, proliferációt és a citokinézis-hosszt mind az egyes sejtek, mind populációik szintjén harmincöt különböző - 12 mezotelióma, 13 melanóma és 10 tüdőrák eredetű –sejt vonalak kétdimenziós kultúráiban.

A 24 óra alatt mért átlagos eltávolodás szignifikánsan nagyobbak bizonyult mezotelióma sejt vonalokban a melanómából vagy tüdőrákból származó sejtekhez képest. A 24 óra alatti osztódások várható értéke egy nagyságrenden belül szórt, a legnagyobb proliferációt mezotelióma sejtek mutattak, majd a melanóma és végül a tüdőrák sejtek. A citokinézis átlagos időtartamában nem találtunk szignifikáns különbséget a tumortípusok között.

Meghatároztuk az osztódások várható értékének, az átlagos eltávolodásnak és a citokinézis-hossznak a korrelációját mindhárom tumor esetén. Pozitív korrelációt találtunk a sejtosztódás és sejtmozgás között melanóma és tüdő sejt vonalokban, míg mezoteliómában nem volt korreláció.

A citokinézis időtartama és a sejtmozgás közötti korrelációt is vizsgáltuk mindhárom esetben. A citokinézis időtartama és a migráció között szignifikáns negatív korrelációt találtunk melanóma esetében. Ugyanakkor mezotelióma és tüdőrák eredetű sejtekben nem volt semmilyen korreláció. A proliferáció és a citokinézis időtartama között csak mezotelióma sejtek esetében volt szignifikáns korreláció.

Mivel a FAK/Src jelátviteli út a sejtmigráció fontos szabályozója, a FAK és Src kinázok aktivációját immunblot eljárással vizsgáltuk a foszforilált fehérje arányának kiszámítása révén. A melanóma sejtvonalakat két csoportra osztottuk a migrációs képességük középértéke mentén, és meghatároztuk a hat leggyorsabb és hat lelassabb migrációt mutató sejtvonalból álló két csoport FAK illetve Src aktivációjának átlagos mértékét. Megállapítottuk, hogy a gyorsan mozgó melanóma sejtekben a FAK aktivációja magasabb, ugyanakkor az Src aktivációja alapvetően egyforma volt a két csoportban.

### **Proliferáció és migráció háromdimenziós sejkultúrákban**

A proliferáció és migráció közötti kölcsönhatás fontos szerepet játszik a daganatok térbeli növekedésében és terjedésében. Bizonyos modellek a proliferációt előfeltételnek tekintik a daganatsejtek környező kötőszövetbe vándorlásának, éppen ezért megvizsgáltuk a sejtosztódás és gélinvázio közötti összefüggést glioblasztóma sejtekben. Vizsgálataink eredményei alapjául szolgáltak egy az extracelluláris mátrixba irányuló sejt-invázio mintázatát leíró matematikai modellnek. Sejtcsoportok kollagéngél inváziós képességét vizsgáltuk a proliferációt gátló szer jelenlétében, illetve hiányában. A kezelés utáni első 24 órában azonban az inváziós mintázatok, illetve a mért migrációs távolságok alapvetően megegyeztek a gátlószerrel kezelt és a kontroll sejtek esetében.

### **Onkogén mutációk a melanóma sejtvonalakban**

Meghatároztuk melanoma sejtvonalaink BRAF és NRAS mutációs státuszát, hogy megvizsgálhassuk, hogy az onkogén mutációk valóban jelentősen befolyásolják-e a melanómasejtek migrációját és sejtosztódását. Négy sejtvonalban találtuk a BRAF (V600E) mutációját, két sejtvonalban az NRAS (Q61K és Q61R) mutációját, míg a

kísérletekben használt további két sejtvonal eme génekre nézve vad típusú volt.

### **Az EGFR és FGFR ligandfüggő aktivációja melanómában**

Mielőtt az ismert mutációs státuszú melanómasejtekben az EGFR és FGFR receptorok aktivációját vizsgáltuk, qPCR alkalmazásával meghatároztuk az EGFR és FGFR gének GAPDH-hoz viszonyított kifejeződését. Mindegyik vizsgált sejtvonalban az EGFR, FGFR1 és FGFR4 magas szintjét találtuk. Érdekesség, hogy FGFR2 és FGFR3 nem írodott át a két NRAS-mutáns sejtvonalban. Elmondható, hogy a növekedési faktorok receptorainak kifejeződése a kétszeres vad típusú sejtekben volt a legalacsonyabb.

Az EGFR és FGFR aktivációjának vizsgálata során a sejteket 50 ng/ml EGF-ral, FGF2-vel, illetve a kettő kombinációjával kezeltük a videomikroszkópos mérések alatt. Először a különböző mutációs státuszú kezeletlen sejtek proliferációját és migrációját hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy mind a BRAF, mind az NRAS aktiváló mutációja a kétszeres vad típusú sejtekhez képest fokozott migrációval és proliferációval járt együtt. Az átlagos migrációs távolságban a BRAF-mutáns és a kétszeres vad sejtek között mutatkozott szignifikáns különbség.

Az EGF- és/vagy FGF2-kezelés sejtosztódásra és sejtleletképességre gyakorolt hatásának mutáció-függését melanómasejteken vizsgáltuk videomikroszkópos felvételek, illetve SRB kolorimetriás mérés alkalmazásával.

A kétszeresen vad típusú sejtek esetében tapasztalható volt a proliferáció mérsékelt fokozódása, ám BRAF vagy NRAS mutánssejteken ilyen hatás nem volt.

Szintén videomikroszkópos felvételek segítségével elemeztük az EGF és/vagy FGF2 migrációra gyakorolt hatását a mutációk függvényében. A migrációra gyakorolt hatás jelentősebb volt a proliferációban bekövetkezett változásokhoz

képest, és a hatás szintén csak a kétszeresen vad típusú sejteken volt látható.

Mindkét kétszeres vad típusú sejtvonal migrációja fokozódott a kezelés hatására, de az EGF az FGF-hez képest nagyobb változást váltott ki. A kombinált kezelés nagyobb növekedést váltott ki a migráció tekintetében az EGF vagy FGF2 kezeléshez képest.

Noha az NRAS-mutáns sejtvonalak egyikében (M24met) szintén megfigyelhető volt a migráció szignifikáns fokozódása FGF2-kezelés hatására, ez a változás jelentősen kisebb volt a vad típusú sejtvonalakban látott változásokhoz képest. Az azonos mutációs státuszú sejtvonalakra számított átlagos migrációs távolságot vizsgálva a BRAF-mutáns sejtek esetében a növekedési faktor-kezelés után nem volt látható változás, és az NRAS-mutáns sejtek esetében is csak csekély változás volt látható az FGF2 illetve a kombinált kezelés hatására.

A növekedési faktorok jelpályáinak két fontos effektora az Erk1/2 és az S6 fehérjék. Ezek foszforiláció általi aktivációját immunblot módszerrel vizsgáltuk. Kontroll körülmények között a BRAF és NRAS mutációjának hordozása a kettős vad típusú sejtekkel összehasonlítva az Erk1/2 és S6 nagyobb mértékű foszforilációjával járt.

A növekedési faktorok hatására a kettős vad sejtekben sokkal nagyobb mértékben nőtt az Erk1/2 és S6 foszforilációja, mint a BRAF- vagy NRAS-mutáns sejtekben. Elmondható, hogy kezelés hatására ezen onkogén mutációt hordozó sejtekben az Erk1/2 és S6 foszforilációjának szintje alig változott a kettős vad sejtvonalakhoz képest.

### **Az EGFR és FGFR gátlása melanóma sejtekben**

Mivel kimutattuk az EGFR és FGFR jelátviteli útvonal onkogén mutációtól függő aktivációját, az EGFR és FGFR gyógyszeres gátlásának hatását is megvizsgáltuk a különböző melanóma sejtvonalakon.

Az EGFR és FGFR jelátvitel mutációtól függő gátolhatóságának vizsgálatára a sejtvonalak 72 órán át tartó EGFR-inhibitor (gefitinib, erlotinib CI-1033 és pelitinib) és FGFR-inhibitor (ponatinib, BGJ-389, BIBF-1120 és AZD-4745) kezelése után a sejtek életképességét mértük. A mutációktól függetlenül sejtvonalaink többsége nem volt érzékeny a gefitinib és erlotinib kezelésre. Bár a CI-1033 és periltinib alkalmazása hatékonyabbnak bizonyult, itt sem volt kimutatható érzékenységbeli eltérés a különböző mutációt hordozó sejtvonalak között.

Hasonlóképpen az FGFR gátlószereinek a sejtek életképességére gyakorolt hatása is függetlennek mutatkozott a sejtek BRAF és NRAS mutációs státuszától.

### **Onkogén mutációtól függő válasz a preniláció gátlására melanómában**

A Ras fehérjeszintézist követő módosításai – így például prenilációja – fontos szerepet játszanak az aktivitásának szabályozásában. Az NRAS onkogén mutációi meghatározó szerepet játszanak malignus melanómában. Ezért vizsgáltuk a zoledron sav általi (ZA) prenilációgátlás hatását BRAF vagy NRAS mutáns illetve mindkét génre vad típusú melanóma sejtvonalakban.

24 óra kezelés után a BRAF-mutáns sejtek morfológiájában jelentős változás volt megfigyelhető. Ezek a sejtek igen elnyújtott alakot vettek fel, míg az NRAS-mutáns vagy kettős-vad sejtek esetében ilyen változás nem, vagy alig volt megfigyelhető.

A ZA különböző koncentrációival történő kezelés után megvizsgáltuk a melanóma sejtek életképességét. NRAS-mutáns sejtek életképességét a ZA-kezelés egyértelműen csökkentette még alacsony koncentrációk alkalmazása esetén is. BRAF-mutáns és kettős vad sejtekben csupán magasabb koncentrációk hatására is csak kisebb mértékű csökkenést lehetett megfigyelni.

Videomikroszkópos módszerrel vizsgáltuk a kezelés melanóma sejtek migrációjára gyakorolt hatását. Átlagosan, a BRAF-mutáns sejtvonalakban a ZA-kezelés nagyobb mértékben növelte a sejtek migrációs aktivitását, mint a vizsgált nem BRAF-mutáns sejtvonalak esetében.

A ZA proapoptotikus hatásának jellemzésére 25 $\mu$ M zoledronsavval kezelt sejtek TUNEL-festését végeztük el. Noha mindkét NRAS-mutáns sejtvonala érzékeny volt a ZA alkalmazására, érzékenységükben jelentős különbség mutatkozott. Az NRAS-mutációt hordozó sejtvonalakról elmondható, hogy esetükben a ZA proapoptotikus hatása kifejezettebben jelent meg, mint a BRAF-mutánsokban, illetve az eme mutációkat nem hordozó sejtvonalakban. Fontos megemlíteni, hogy a TUNEL alkalmazásával kapott, az apoptotikus sejtek számára vonatkozó eredményeink megegyeztek az életképességi vizsgálatok eredményeivel.

Az NRAS-mutáns melanoma sejtvonalaik esetében látható jelentős apoptotikus hatás hátterének vizsgálata végett a RAS-jelátviteli útvonalban fontos szerepet játszó S6 riboszomális fehérjének aktivációját immunoblot módszerrel jellemeztük. A ZA-kezelés az S6 fehérje fokozott aktivációjával járt az M24met NRAS-mutáns sejtvonalaiban, míg az aktiváció csökkenése volt megfigyelhető a másik vizsgált NRAS-mutáns sejtvonalaiban. Az S6 aktivációjában látott különbségek megfelelték a TUNEL vizsgálat eredményével.

A ZA primer tumorok növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálatára humán melanóma sejteket injektáltunk NSG egerek hátán a bőr alá. A ZA nem gátolta a szubkután tumorok növekedését. Az áttétképzésre gyakorolt hatását lépből májba kolonizációval vizsgáltuk. A ZA nem gátolta meg az NRAS-mutáns és kettős vad sejtek áttétképzését, és a BRAF-mutáns sejtek esetében is csak csekély mértékben fejtett ki gátló hatást. Fontos különbség volt továbbá, hogy a ZA alacsonyabb koncentrációban (50 $\mu$ g/kg) alkalmazva szignifikánsan növelte az áttétképződést kettős vad típusú sejtvonalaik esetén.

### **Az aktivin jelátviteli út befolyásolása mezoteliómában**

Különböző tumorokban az aktivin jelátvitel aktiválása mind a a tumorok progressziójához mind a tumornövekedés gátlásához hozzájárulhat. Azonban a jelátviteli út mezoteliómában játszott szerepére vonatkozóan korábban nem történt vizsgálat. Videomikroszkópos felvételeken elemeztük az aktivin A (20 ng/ml), az SB431542 aktivin-receptor inhibitor (20  $\mu$ M) és ezek kombinációjának proliferációra és sejtmozgásra gyakorolt hatását.

Az aktivin receptorok egyik gátlószerét, az SB-431542-t önmagában vagy kombinációban alkalmazva csökkentette az M38K mezotelióma sejtek proliferációját. Ezzel szemben a P31 sejt vonal sejtjeiben sem az aktivin-receptor gátlása, sem annak aktivációja nem befolyásolta a proliferációt. A sejtek migrációs aktivitása az M38K sejtek esetében a proliferációval ellentétben növekedett változott, míg a P31 sejtek esetében a migrációban sem volt változás.

A videomikroszkópia kivételes lehetőséget biztosít a rendellenes citokinézisek azonosítására. A P31 mezotelióma sejt vonal sejtjeinél már kezelések nélkül is megfigyelhető volt ez a jelenség: a mitózisok majdnem 2%-a volt multipoláris. Az aktivin receptorokat gátló SB-431542 önmagában vagy kombinációban történő alkalmazása szignifikánsan magasabb arányú multipoláris, többségében hárompólusú sejtosztódáshoz vezetett.

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. A “go or grow” hipotézist nem támasztottuk alá, mivel nem találtunk negatív korrelációt a proliferáció és migráció között. Ezzel szemben pozitív korrelációt állapítottunk meg a migráció és proliferáció között melanómából és tüdőrákból származó sejtek esetében.
2. Kollagénbe ágyazott multicelluláris glioma szferoidok esetében kimutattuk, hogy a mátrix inváziójának nem előfeltétele a proliferáció.
3. A mutációs státusztól függő EGF és FGF válasz vizsgálatánál alacsonyabb migrációs és proliferációs alapaktivitást és magasabb indukálhatóságot mutattunk ki dupla vad melanóma sejteken, mint onkogén NRAS vagy BRAF mutáns melanómákon. Ezzel szemben a GF receptor tirozin-kináz inhibitorok onkogén mutációtól független hatást mutattak.
4. A preniláció gátlás mutáció függésének vizsgálatánál a preniláció gátlás a proliferáció csökkenését és a sejtmozgás növekedését okozta *in vitro* NRAS mutáns melanóma sejtek esetében. A BRAF mutáns és a dupla vad melanóma sejteknél *in vivo* áttétképzés növekedését tapasztaltunk. Az apoptózis indukció az NRAS mutáns melanóma sejtek esetében arra utal, hogy a prenilációt célzó terápiák ebben a molekuláris alcsoportban lehetnek hatékonyak.
5. Mezeteliómák esetében az aktivin receptor aktiválására és gátlására adott migrációs és proliferációs válaszokból arra következtethetünk, hogy az aktivin szignalizáció daganatserkentő hatással bír. Az eredmények alapján az aktivin hatékony terápiás célpont lehet mezotelióma kezelésében.



## **KÖZLEMÉNYEK**

### **Közlemények az értekezés témájában**

1. Garay T, Juhász E, Molnár E, Eisenbauer M, Czirók A, Dekan B, László V, Hoda MA, Döme B, Tímár J, Klepetko W, Berger W, Hegedűs B.: Cell migration or cytokinesis and proliferation? - Revisiting the "go or grow" hypothesis in cancer cells in vitro. *Exp Cell Res.* (impakt faktor 2012: 3,557), 2013
2. Hoda MA, Münzker J, Ghanim B, Schelch K, Klikovits T, Laszlo V, Sahin E, Bedeir A, Lackner A, Dome B, Setinek U, Filipits M, Eisenbauer M, Kenessey I, Török S, Garay T, Hegedus B, Catania A, Taghavi S, Klepetko W, Berger W, Grusch M.: Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *British Journal of Cancer*, 107(12):1978-86. (impakt faktor: 5,042), 2012
3. Szabó A, Varga K, Garay T, Hegedűs B, Czirók A.: Invasion from a cell aggregate—the roles of active cell motion and mechanical equilibrium. *Physical Biology* 9 016010, (impakt faktor: 2,595), 2012

### **Egyéb közlemények**

1. D. Lötsch, E. Steiner, K. Holzmann, S. Spiegl-Kreinecker, C. Pirker, J. Hlavaty, H. Petznek, B. Hegedus, T. Garay, T. Mohr, W. Sommergruber, M. Grusch, W. Berger: Major vault protein supports glioblastoma aggressiveness via stabilization of EGFR/PI3K-mediated survival and migration signals. *Oncotarget* (impakt faktor: 6,64), 2013 accepted
2. Illyés Z., Halász K., Rudnóy Sz., Ouanphanivanh N., Garay T., Bratek Z.: Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 28-36. (impakt faktor: 0,523), 2009

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

PhD tanulmányaim alatt szerencsés módon lehetőségem nyílt, hogy számos segítőkész kutatóval több különböző laboratóriumban találkozjam. Mindenekelőtt hálás vagyok anyaintézetemnek, a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetének. Megtisztelő volt továbbá, hogy kutatásaim egy részét a Bécsi Orvostudományi Egyetem Rákkutató Intézetében, illetve az Oslói Egyetemi Kórház Rákkutató Intézetének Tumorbiológiai Osztályán végezhettem. A jól végzett munka örömét élhettem át kutatótársaimmal, akik az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézetben, az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályán, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biofizika Tanszékén, a University of Kansas Medical Center Anatómiai és Sejtbiológiai Tanszékén és a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkassebészeti Tanszékén végzik munkájukat.

Legelőször témavezetőmnek, Hegedűs Balázsnak szeretnék köszönetet mondani, aki kezdetektől vezette lépéseimet és aki – örökké kritikus hozzáállásom ellenére – példát tudott mutatni tudománnyal, karrierépítéssel és az életvezetéssel kapcsolatban. Különös hálával tartozom Tímár Józsefnek, a II. Sz. Patológiai Intézet vezetőjének, aki támogatta kutatásaimat, szakmai előmeneteletem valamint bölcs kritikával és tanácsokkal segítette munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá a II. Sz. Patológiai Intézet munkatársainak: Molnár Eszter, Juhász Éva, Réti Andrea, Gaál Anikó, Bilecz Ágnes, Hegedűs Zita, Rásó Erzsébet, Barbai Tamás, Gyöngyösi Benedek, Kenessey István, Szász Marcell, Lendvai Gábor, Horváth Csilla, Piurkó Violetta, Gregor Viktória és Schönfeld Tibor. Külön köszönetemet

fejezem ki Balogh Lenkének és Seres Jánosnének, akiknek munkája nélkül megállna az intézetünk.

Hasonlóan köszönetet szeretnék mondani más budapesti intézetek munkatársainak, különösképpen Tóvári Józsefnek, Czirók Andrásnak, Döme Baláznak, Török Szilviának, Cserepes T. Mihálynak, Keszthelyi Magdolnának, Dobos Juditnak és Bogdán Natáliának.

Hálával tartozom Walter Bergernek az inspiráló beszélgetésekért és hogy bécsi ösztöndíjaim fogadó professzora volt. Továbbá szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akikkel Bécsben együtt dolgozhattam: Karin Schelch, Christine Pirker, Michael Grusch, Maria Eisenbauer, Julia Münzker, Claudia Engelmaier, Nikolaus Floimayr, Daniela Lötsch, Rosa Weiss (Institute of Cancer Research) és Barbara Dekan, László Viktória, Rózsás Anita, Andreas Wagner, Mir Alireza Hoda and Bahil Ghanim (Translational Thoracic Oncology Laboratory, Department of Thoracic Surgery in Vienna).

Szeretnék továbbá köszönetet mondani Øystein Fodstadnak, aki oslo-i ösztöndíjam fogadó professzora volt. Továbbá Karianne Risbergnek (Institute for Cancer Research, Oslo University Hospital) és Marco Donianak (Center for Cancer Immune Therapy, Copenhagen University Hospital) hogy együttműködhetünk egy postdoc éveimre átnyúló roppant érdekes projektben.

És végül, szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a háttérrel biztosították PhD-s munkámhoz. Hálával tartozom családomnak, különösen feleségemnek és szüleimnek, akik engedték, hogy messzire utazzam, korántól későig dolgozzam és bátorítottak, ha nem ideálisan alakultak a dolgok. És külön köszönet iker fiaimnak, akik nélkül a disszertáció nem íródott volna meg ilyen gyorsan.