

## Az eredmények részletes ismertetése

A csontvelői őssejtek érése szigorúan szabályozott folyamat eredménye. A szaporodás, túlélés vagy halál, illetve a differenciáció során lezajló folyamatok szabályozásának sérülése a normális vérképzés károsodásához és betegségek kialakulásához vezet. Az egészséges vérképzésben, illetve a kóros folyamatok kialakulásában résztvevő jelátviteli utak és ezek kölcsönhatásai csak részleteiben ismertek. Pályázati munkánk során az apoptotikus jelpályák, illetve a különböző irányú differenciációkhoz vezető jelpályák együttes tanulmányozása révén kívántunk új információkkal szolgálni a hematopoezis összetett folyamatának valamint az eritroleukémia sejtek újraprogramozásának kulcslépéseinek megismeréséhez.

### Ezen belül kiemelten kívántuk vizsgálni:

-azokat a mechanizmusokat, amelyek az eritropoetintől függetlenül, vagy annak hatását befolyásolva képesek az eritroid sejtek hemoglobin képzését fokozni,

-az ERK MAPK útvonal különböző szinteken történő gátlásának hatását az eritroid differenciációra, az ERK aktivitás kinetikájának hatását a differenciációs és apoptotikus folyamatokra,

-a kaszpázok és különböző transzkripciós faktorok aktiválásához vezető folyamatokat és ezek hatását a differenciációra ill. az apoptózisra,

-Bcr/Abl + humán dipotens K562 leukémia sejtekben a Bcr/Abl jelpálya gátlásának hatását a leukémiás sejtek differenciációjára és apoptózisára,

-a Bcr/Abl jelpálya gátlásának hatását a közvetítő útvonalakra és transzkripciós faktorokra, a jelpálya többirányból történő gátlásának hatékonyságát különböző gyógyszerkombinációk alkalmazásával, egyedi terápiák lehetőségét,

-az imatinib rezisztencia hátterében álló MDR1 és ABCG2 multidrog rezisztencia fehérjék szerepét különböző másodgenerációs tirozin kináz gátlók (TKI) citotoxikus hatásosságában,

-különböző makrofágok aktiválódása révén keletkező gyulladáshoz vezető mediátorok hatását a MAP kinázokra, a béta adrenerg receptor közvetítette jelpályák és az ERK aktiváció kölcsönhatását a szimpatikus idegrendszer immun-moduláló hatásában.

### **I. ERK MAPK útvonal gátlásának hatása az eritroid differenciációra különböző egér és humán hormonfüggő és hormon független mielo-eritroid sejtekben.**

Korábbi OTKA pályázatunkban (T 029291) kimutattuk, hogy a citoplazmatikus kalciumszint  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedése önmagában képes differenciációt indukálni egér mieloeritroid (ELM-1, F4-6) sejtekben és ez a hatás az eritropoetin (Epo) függő ELM-1 sejtekben additív hatású az eritropoetinnel.

**1.-**Mostani munkánk során megállapítottuk, hogy **F4-6 és ELM-1 egér mielo-eritroid sejtek eritroid differenciációja együtt jár a mitogén MEK/ERK aktivitásának csökkenésével** függetlenül attól, hogy a differenciációt DMSO-val, butiráttal vagy a  $[Ca^{2+}]_i$  emelésével idéztük elő. **Hasonló eredményt kaptunk humán K562 sejtekben is** hemin vagy butirát kezelés hatására. A különbözőképpen kiváltott ERK aktivitás csökkenése additívan hatott a sejtek hemoglobin termelésére (1,11,12).

**2.-**Kimutattuk továbbá, hogy GM-CSF függő, Epóra differenciálódni képes **humán CD34+ TF-1 mielo-eritroid sejtekben, a kalcium szint emelkedése az ERK aktiválásán keresztül**

**gátolta, míg Epo-ra szenzitív ELMI-1 sejtekben az ERK aktivitás csökkentésén keresztül fokozta az Epo indukálta hemoglobin képződést és c-Myb expresszió-csökkenést (11,12).** ELMI-1 sejtekben az Epo egy nagyon gyors, átmeneti ERK aktivitást is eredményezett, amelynek az Egr-1 transzkripciós faktor aktiválásán keresztül a sejtek proliferációjában van szerepe. A MEK gátlók (UO126 és PD98059) fokozták, míg a p38 kináz gátlószere (SB203580) gátolta az Epo indukálta hemoglobin képződést (2). Ebben feltehetően szerepe van annak a megfigyelésünknek, hogy a különböző mielo-eritroid sejtekben az SB203580 önmagában fokozza az ERK foszforilációját és ezúton az Egr-1 transzkripciós faktor mennyiségét és DNS kötő képességét is. **Eredményeink azt mutatják, hogy ugyanaz a sejt ugyanarra a hormon-stimulusra adott választ az ERK aktivitás időbeli lefutása, a továbbító jelpályák különbözőképpen történő aktiválása révén, döntően befolyásolhatja.**

**3.-F4-6 és TF-1 sejteket különböző citoplazmatikus kalcium szint emelő szerek mellett vizsgálva gél-mobility shift assay (EMSA) segítségével megállapítottuk, hogy az AP-1 transzkripciós faktor DNS kötő képességének szabályozása F4-6 sejtekben kalcium/kalmodulin függő folyamat, míg TF-1 sejtekben MEK/ERK/ELK függő (16).** Ugyanakkor azt is megállapítottuk, **hogy TF-1 sejtekben a kalcium függő kalpain enzim szerepet játszik a sejtciklus S fázisának ellenőrzési pontjának szabályozásában (3).**

**4.-A pályázat benyújtása és elfogadása közti időben TF-1 sejteken igazoltuk, hogy a tartósan fenntartott ERK aktivitás az ERK/ELK-1/c-Fos/AP-1 útvonal aktiválásán keresztül apoptózishoz vezet (A23187 kalcium ionofor hatására) (4),** ugyanakkor a bifázikus, kontrollált ERK aktivitás-növekedés a sejtek túléléséhez és növekedéséhez szükséges (GM-CSF illetve ionomycin hatására).

**Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a MAPK/ERK útvonal aktiválódásának mértéke és kinetikája döntően befolyásolja a sejtválaszt és meghatározza, hogy a mielo-eritroid sejtek differenciálódnak, osztódnak vagy apoptótizálódnak.**

**5.-Közlés alatt álló munkánkban bemutatjuk, hogy a sejtek hemoglobinképzésének fokozásához elégséges az ERK gátlása, de a terminális differenciációhoz nem.** F4-6 sejteken végzett kolonialeképzési vizsgálataink szerint a terminális differenciációra jellemző koloniaszám csökkenés csak DMSO mellett mutatható ki. **A folyamatban a PU.1 transzkripciós faktor expressziójának változása játszhat fontos szerepet.** DMSO jelenlétében a PU.1 expresszió csökkenése mind mRNS,- mind fehérje szinten kimutatható, míg  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés vagy a MEK/ERK útvonal gátlás (UO126) esetében nem. Mindhárom indukálószer jelentősen csökkenti az eritroid génekre represszor tulajdonsággal rendelkező c-myb mRNS szintjét és a fehérje DNS kötését és jelentősen emeli az eritroid specifikus NF-E2 DNS kötését. **Ezek a változások feltehetően az ERK aktivitás csökkentésén keresztül az eritroid differenciáció kezdeti szakaszában játszanak fontos szerepet (12).**

**6.-F4-6 sejteken végzett kísérleteink segítettek hozzá, hogy az MTA SZBK Enzimológiai Intézetével együttműködve hatékonyan hozzájáruljunk egy újfajta külső sejt kontrollon alapuló kvantitatív mRNS meghatározási módszer kidolgozásához. (External cell control quantitative RT-PCR (eccPCR)), amelyből szabadalmi bejelentés is történt.** A módszer lényege, hogy a qRT-PCR-hez szükséges RNA izolálás előtt a vizsgálandó sejteket ismert arányban megfelelő kontroll sejtekkel (mint az F4-6) keverjük. A referencia gént (mint a PU.1) csak a kontroll sejt, míg a keresett gént csak a vizsgált sejt tartalmazza. A módszer segítségével biztonságosabban lehet kis fehérje-expresszióbeli különbségeket mRNS szinten meghatározni (5).

## **II. Bcr/Abl + humán dipotens K562 leukémia sejtekben a Bcr/Abl jelpálya gátlásának hatása a leukémiás sejtek differenciációjára és apoptózisára**

1.- Bcr/Abl fúziós fehérjét tartalmazó, CML eredetű K562 sejtekben kimutattuk, hogy a **Bcr/Abl jelpálya gátlása** a klinikumban egyre szélesebb körben alkalmazott Bcr/Abl tirozin kináz gátlószerekkel, az **imatinibbel (ST571, Glivec)** a sejtek eritroid irányú **differenciációját eredményezi**. Imatinib hatására rövid idő alatt csökkent a Bcr/Abl, STAT-5 és ERK foszforiláció, csökkent a c-myc mRNS expresszió, csökkent a proliferációs gének aktiválásában részt vevő AP-1 és emelkedett az eritroid specifikus NF-E2 transzkripció faktorok DNS kötésének mértéke. A globin mRNS szint emelkedése mellett, az imatinib koncentrációjától függően, csökkent az anti-apoptotikus Bcl-xl mennyisége, aktiválódott a kaszpáz 3 és megindult a sejtek apoptózisa. K562 sejteken végzett kísérleteink eredményei alátámasztották korábbi megfigyelésünket, hogy a p38 MAK kináz aktiválódása egyes irodalmi adatokkal ellentétben nem az eritroid differenciációhoz, hanem a sejtek apoptózisához kapcsolható (13).

2 **Kísérleteink lehetővé tették a differenciáció és apoptózis szétválasztását az ERK aktivitás időbeli változásán keresztül**. Ehhez a munkához csatlakozott Hegedüs Csilla, biológus, akinek TDK-ás dolgozata (2005-ben első díjat nyert a budapesti versenyen), szakdolgozata és Ph.D. munkája is a Bcr/Abl jelpálya vizsgálatához kötődik. Az ERK útvonal szelektív gátlószere, a **MEK inhibitor UO126**, 5  $\mu$ M koncentrációban **gyors átmeneti ERK aktivitás-csökkenéshez** vezetett, amely elegendő volt a sejtek hemoglobin tartalmának fokozására, a c-Myb, az EGR-1 expressziójának csökkentésére, **de nem indukált apoptózist** (1). Hasonló eredményt kaptunk, ha a sejteket a klinikumban alkalmazott koncentrációnál lényegesen alacsonyabb, **0,1  $\mu$ M koncentrációjú imatinibbel** kezeltük. Ebben a koncentrációban csak **átmeneti volt a Bcr/Abl autofoszforilációjának** (és ezen keresztül a **STAT-5, a MEK/ERK/ ELK útvonalak**) gátlása, ugyanakkor a sejtek közel **80%-ban már hemoglobint termeltek** (1,17). A CDK inhibitor **p21 expressziója** már ennél az alacsony, csak differenciációt indító imatinib koncentrációnál is **jelentősen emelkedett** a kezelt sejtekben, ami arra utal, hogy **az S fázisba történő átmenetel gátlásának fontos szerepe van a sejtdifferenciációban**. Metocellen végzett kísérleteink azt mutatták, hogy ebben az alacsony koncentrációban, az imatinib még nem gátolta a sejtek kolóniaképző képességét, így a sejtek nem terminálisan differenciáltak (12).

**Magasabb, de még a legalacsonyabb terápiás dózisnak megfelelő koncentrációban (0.5-1 $\mu$ M) az imatinib nem csak a sejtek hemoglobinképzését fokozta, de 48-72 órán belül a sejtek kaszpáz függő apoptózisához vezetett**. Ilyenkor a mitogén jelpályák tartósan gátlódtak, csökkent az NF-kappaB magi transzlokációja és a PU.1 expressziója, míg aktiválódott a p38 és a JNK MAP kináz (1,13,16).

3.-Vizsgáltuk a **Bcr/Abl fehérje** expressziójában bekövetkező változásokat is az eritroid differenciációra. FISH tanulmányaink szerint a K562 sejtek magas **(10-12) kópiaszámban** tartalmazzák a fúziós fehérjét. **Mennyiségének csökkentésére siRNS módszert alkalmaztunk**. **Stabil retrovirális transzdukcióval** jutattuk be a bcr-abl mRNS degradációját elősegítő siRNS DNS templátját K562 sejtekbe. Vektorunk a transzdukció követésének elősegítésére GFP riporter gént is tartalmazott. A 90 %-ot meghaladó transzdukciós határfok ellenére is **csak részleges és átmeneti Bcr/Abl fehérje-szint csökkenést tapasztaltunk, amely együtt járt a STAT-5 és ERK aktivitás valamint a c-myc mRNS expresszió csökkenésével**. Ez az átmeneti változás a Bcr/Abl jelpályában

elégő volt a sejtek hemoglobin termelésének fokozásához, vagyis a differenciációs blokk feloldásához, de nem volt elégséges a sejtek apoptózisához (1).

**III. A megszokott protokollok alkalmazásakor fellépő primer és szerzett gyógyszer-rezisztencia miatt egyre nagyobb az igény individuális terápiák kísérleti hátterének kidolgozására.**

1.-Kéri György professzorral (Vichem) való együttműködésben **vizsgáltuk számos Src kináz, proteoszóma, cdk, IMP, HDAC gátlók hatását önmagában és alacsony illetve terápiás koncentrációjú imatinibbel kombinálva a sejtek túlélésére, a sejtek további differenciációjára valamint a főbb mitogén, differenciációs és apoptotikus folyamatokra, annak tisztázására, hogy a differenciált sejtek érzékenyebbek-e különböző apoptotikus stimulusokkal szemben** (16). Kísérleteinket először K562 sejteken végeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy az **alacsony koncentrációjú imatinibbel** előkezelt sejtekben az **arzén**, nem toxikus koncentrációban (1 $\mu$ M), 24 órával a kezelés után jelentősen emelte a p38 és JNK foszforilációt, a p21 expressziót és csökkentette a Bcr/Abl, valamint az antiapoptotikus Bcl-x1 fehérje mennyiségét és ezzel **csökkent az élő sejtek száma**.

-2 mM **valproat** 0,1  $\mu$ M imatinibbel kombinálva a sejtek 70 %-os pusztulását eredményezte 48 órán belül. Ezek a koncentrációk önmagukban nem befolyásolták a sejtek életképességét. Megfigyeltük, hogy a valproat nem csökkentette az ERK foszforilációt, sőt jelentős EGR-1 expresszióhoz vezetett, ami felvetette **egy megakariocita irányú differenciáció** lehetőségét. Ezt a feltevést támogatta FACS-os eredményünk is, amely során valproat kezelés mellett emelkedett számú diploid sejtet találtunk. A 2 mM valproattal kezelt sejtek fokozott érzékenységet mutattak nem csak imatinibbel, de arzénnal (1  $\mu$ M) és proteoszóma inhibitor PSI-vel (5 nM) szemben is.

-Beállítottunk egy módszert, amelynek segítségével K562 sejtekben követni tudtuk a hiszton 3 és hiszton 4 fehérje acetilációs illetve foszforilációs állapotát. Ennek segítségével kimutattuk, hogy a **valproat már a kombinációkban használatos, alacsony 2 mM koncentrációban is fokozta a magi hisztonok acetiláltságát és feltehetően ezen keresztül emelte a CDK inhibitor p21 mennyiségét**. Kis koncentrációjú imatinibbel előkezelt sejtekkel kombinációban a valproat a nagyobb koncentrációjú imatinibhez (0.5  $\mu$ M) hasonlóan **fokozta a sejtek hemoglobin tartalmát és jelentős apoptózist indukált**.

-Az **Src útvonal szelektív gátlása** nem toxikus koncentrációjú 2.5  $\mu$ M PP1 inhibitorral nem indukált önmagában differenciációt, ahogy azt a MEK/ERK/ ELK útvonal átmeneti gátlásánál tapasztaltuk (5  $\mu$ M UO126 kezelés), de **alacsony koncentrációjú imatinibbel kombinálva jelentősen felerősítette annak hatását** mind a sejtek differenciációjára, mind az apoptózisára.

-A PP1 kezeléshez hasonlóan, a nem toxikus koncentrációjú (5 nM) **mTor gátló rapamycin is fokozta az imatinib hatását a sejtek hemoglobin termelésére, ami egyben azt is utal hogy a PI3K útvonal aktivitásának csökkenése elősegítheti a sejtek eritroid differenciálódását**

Különböző gyógyszerkészítmények kombinációjával végzett eredményeink alátámasztják azt a feltevést, hogy a **mitogén jelpálya többirányú támadása hatékonyan működhet egyes leukémiák kezelésében és hogy a differenciációs blokk feloldása fokozza a sejtek érzékenységét a pro-apoptotikus hatások iránt** (16).

2.-**Klinikus partnerünkkel** (Dr. Nahajevszky Sarolta, egykori OHVII, OGYK, jelenleg Szent László Kórház) **együttműködésben**, leukémiás betegek csontvelőjéből ill. perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekből több esetben készítettünk primer sejtenyészeteket. Ezt követően a sejteket a klinikumban ismert szerek kombinációs kezelésének vetettük alá.

Tirozin kináz gátlók mellett különböző proteoszóma, cdk, IMP, HDAC gátlókat használtunk és követtük a sejtek túlélését valamint a főbb jelpályák (MAPK, STAT), és az anti-apoptotikus fehérjék mennyiségének és aktivitásának változásait. Ilyen jellegű vizsgálatok vezettek egy CML-BC basofil leukémiás meningitis formájában jelentkező relapszus esetében a hatásos kombináció megtalálásához. Az imatinib rezisztens beteg perifériás vérmintájából készült primer mononukleáris sejt kultúrában valproat, illetve a valproat/imatinib kezelés hatására jelentős sejtpusztulás volt kimutatható (14,15).

-A munka folytatásaként az ígérkezik, hogy CML-es betegek csontvelői sejtjeiből elkülönítsük a leukémiás őssejtekben dús frakciót (CD34+, CD38-) és kidolgozzuk ezek hosszútávú kultúrában tartásának (az önmegújító képesség megtartásával) körülményeit, hogy ezeken vizsgálhassuk a különböző gyógyszerkészítmények és ezek kombinációinak citotoxikus hatásosságát.

#### **IV. A permanensen aktivált tirozin kinázok gátlásán alapuló terápiaik hatékonyságát a kialakuló rezisztenciák és a különböző multi-drog fehérjék expressziója egyaránt csökkenti.**

1.-Dr. Apáti Ágota, majd Hegedüs Csilla PhD. hallgató közreműködésével bekapcsolódtunk Sarkadi Balázs professzor vezette ABC transporterek kutatásával foglalkozó csoport munkájába. Kimutattuk, hogy az **ABCG2 multidrog transzporter képes a klinikumban használatos Iressa (ZD1839) EGFR tirozin kináz gátlószer aktív eltávolítására.** EGFR jelpálya függő **tumorsejtben (A431)** az ABCG2 kifejeztetése retrovirális transzdukcióval **jelentősen megnövelte az EGFR auto-foszforilációjának gátlásához szükséges Iressa koncentrációját.** Ez a folyamat domináns negatív ABCG2 illetve az ABCG2 transzporter gátlószere jelenlétében nem következett be (6).

2.-Az MDR-ABC fehérje család két tagjáról (**MDR1, ABCG2**) ismert, hogy a Bcr/Abl fúziós kináz gátlószerével, a klinikumban széles körben alkalmazott **imatinibbel is kölcsönhatásba lépnek (7).** A **hosszabbítás évében** (2008, amelyre azért volt szükség, mert 2006 és 2007 folyamán az intézetünk átszervezése miatt részben vagy egészben ellehetetlenült az OTKA támogatáshoz való hozzájutásunk), vizsgáltuk ezeknek a fehérjéknek a szerepét különböző másodgenerációjú Abl és Abl/Src kináz gátló (nilotinib, dasatinib és bosutinib) pro-apoptotikus hatásosságának megváltozásában.

-Az MDR-ABC transzporter funkciót CML eredetű K562 modellsejtekben vizsgáltuk, amelyben az **MDR1 fehérje mennyiségét gyógyszer-szelekcióval, illetve az ABCG2 mennyiségét retrovirális transzdukcióval emeltük meg mesterségesen.** A sejtekben citotoxicitást, calcein AM és Hoechst 33342 kilökődést mértünk különböző drogok mellett. Ezenkívül MDR1 és ABCG2 fehérjét overexpresszáló SF9 rovarsejt membránjában mértük a vanadát szenzitív ATP-áz aktivitást és **kidolgoztunk egy nagy érzékenységgű HPLC-MS módszert a sejteken belüli tirozin kináz gátlók mennyiségének direkt meghatározására.**

-Követtük a vegyületek hatását a **Bcr/Abl jelpályára is.** Mind a K562 mind a K562/MDR1 és K562/ABCG2 sejtekben **konstitutívan magas a foszforilált Bcr/Abl fehérje mennyisége, amely a tirozin kináz gátlók jelenlétében a kontroll sejtekben igen erősen, a transzportereket kifejező sejtekben enyhén csökkent, de ez a csökkenés jelentősen felerősödött, ha MDR1 vagy ABCG2 gátlókat alkalmaztunk.**

-Eredményeink azt mutatták, hogy a **vizsgált vegyületek eltérően léptek kölcsönhatásba a különböző transzport fehérjékkel,** így a nilatinib magas affinitással, kis koncentrációban (fél maximális gátlás 100 nM), míg a dasatinib és a bosutinib csak jóval nagyobb koncentrációban (1-2 uM). További vizsgálataink azt mutatták, hogy a nilatinib és a dasatinib

magas aktivitású ABCG2 szubsztrátok és a fehérje mindkét gyógyszer citotoxikus hatását kivédte, míg az MDR1 csak a dasatinib ellen védte a sejteket.

**-Elsőnek mutattuk be, hogy a bosutinib pro-apoptotikus hatását sem az MDR1 sem az ABCG2 nem függeszti fel** és ez magyarázatul szolgálhat a vegyület alkalmazásakor észlelt kedvezőbb klinikai hatásoknak. **Kísérleteink tanulsága szerint, az általunk végzett összetett, több oldalú vizsgálat fontos preklinikai információkkal szolgálhat az újonnan bevezetni kívánt tirozin kináz gátlók anti-tumor hatásának megítélésében még egyes gyógyszerrezisztens tumorok esetében is. Az MDR-ABC transzporter- tirozin kináz gátló kölcsönhatás vizsgálata továbbá hozzásegíthet az új gátlószer ADME-Tox tulajdonságainak jobb megismeréséhez is (18).**

**V.-Az MTA-KOKI Vizi E.Szilveszter professzor vezette Neuroimmunológiai Kutatócsoportjában Dr. Szelényi Judittal együttműködve vizsgáltuk a különböző makrofágok aktiválódása révén keletkező gyulladásos mediátorok hatását a MAP kinázokra.** Együttműködésünk már régóta tart és több közös, sikeresen lezárult OTKA kutatást eredményezett.

1.-Ebben a munkában megállapítottuk, hogy **a szimpatikus idegrendszer termelte neurotranszmitterek nem csak gátolni tudják az immunválaszt i.p makrofág, illetve makrofág irányba differenciáltatott human myelo-monocyta leukemia (PLB-985) sejtekben, hanem a stimulustól függően aktiválni is.** Összefüggést találtunk az ERK és p38 MAP kináz aktivitásának mértéke és időbeli lefutása és az izoproterenol stimulus függő immunmoduláló hatása között (8). **Így olyan különböző eredetű és funkciójú sejteken is, mint hormon függő és független mieloeritroid, primer T limfociták (9) és primer monocita-makrofág, igazoltuk, hogy a jelátvitel során aktiválódó kinázok aktivitásának időbeli lefutása döntően befolyásolja a kialakuló sejtválaszt.**

2.-Elsőként figyeltük meg továbbá, hogy az isoproterenol makrofágokban is képes a **beta adrenerg receptor PKA függő foszforilációján keresztül egy Gs/Gi „switch”-et létrehozni, ezáltal egy PTX (Gi jelpálya gátló) szenzitív átmeneti ERK aktivációt előidézni.** Bizonyítottuk, hogy ez a mechanizmus állhat az isoproterenol immunstimuláló hatása mögött PMA aktiválta makrofágok esetében (10). További kísérleteinkben megállapítottuk, hogy az isoproterenol előkezelés jelentősen csökkenti a MAP kinázok LPS hatására történő foszforilációját, és **ez egy új, eddig még nem leírt mechanizmusa lehet a béta-adrenerg immunszupressziónak.** A PKC útvonal forbolésterrel történő aktivációjakor is termelődnek gyulladásos citokinek, de az isoproterenol előkezelés ebben az esetben fokozza mind a MAP kinázok aktivitását mind a makrofágok immunválaszát (10).

### **Összefoglalva a pályázati munka során elért legfontosabb eredményeinket:**

Többféle sejtmodellben, különböző differenciációt indukáló szer alkalmazása mellett összefüggést találtunk az eritroid differenciáció és a növekedési útvonalak, ezen belül is kiemelten az ERK-1 MAP kináz, aktivitásának csökkenésében.

Epo szenzitív ELM-1-egér mielo-eritroid sejteken kimutattuk, hogy ugyan az a sejt ugyan arra a hormon-stimulusra adott válaszát az ERK aktivitás időbeli lefutása a továbbító jelpályák különbözőképpen történő aktiválása révén döntően befolyásolhatja.

CD34+, GM-CSF függő humán TF-1 sejteken igazoltuk, hogy a tartósan fenntartott magas ERK aktivitás apoptózishoz vezet.

Bemutattuk, hogy a kalcium függő kalpain enzim szerepet játszik a sejtciklus S fázisának ellenőrzési pontjában.

Igazoltuk, hogy az ERK aktivitás csökkenése a hemoglobin tartalom emelkedése mellett az eritroid differenciáció kezdeti szakaszában játszik szerepet, de nem elegendő a terminális differenciáció kialakulásához.

Részt vettünk egy újfajta külső sejtes kontrollon alapuló mennyiségi mRNS meghatározási módszer (eccPCR) kidolgozásában, amelyből szabadalmi bejelentés történt.

CML eredetű Ph+ K562 sejteken igazoltuk, hogy a konstitutívan aktív Bcr/Abl jelpálya gátlása a klinikumban használt Abl tirozin gátló imatinibbel, vagy a Bcr/Abl fehérje mennyiségének csökkentése siRNS módszerrel egyaránt a sejtek hemoglobin termelésének növekedéséhez vezet.

Az ERK aktivitás időbeli változása alapján szét tudtuk választani és külön tanulmányozni a differenciáció és az apoptózis folyamatát. Egy átmeneti ERK aktivitás-csökkenés már csökkenti az eritroid differenciációhoz szükséges génekre szupresszor tulajdonsággal rendelkező c-Myb mennyiségét és DNS kötését, a sejtciklus S fázisba történő átmenetét, de növeli az eritroid gének kifejeződéséhez szükséges NF-E2 DNS kötését.

A tartós ERK aktivitás csökkenés apoptózishoz vezet. Ez, a megemelkedett hemoglobinképződés mellett, együtt jár a kaszpáz-3, a JNK, p38 MAP kinázok aktiválásával és az anti-apoptotikus fehérjék, a magi NF-kappaB, a PU.1 transzkripciós faktorok mennyiségének ill. DNS kötésének csökkenésével.

K562 sejteken és leukémiás betegekből származó mononukleáris sejtek primer tenyészetben bizonyítottuk, hogy a növekedési jelpálya egyidejű, több irányból történő támadása kedvező pro-apoptotikus hatást eredményezhet. Többféle gyógyszer-kombinációban bemutattuk, hogy a leukémiás sejtek differenciációs blokkjának feloldása fokozza a sejtek érzékenységét különböző pro-apoptotikus szerekekkel szemben.

EGFR jelpálya-függő tenyészetben (A431) kimutattuk, hogy az ABCG2 multidrog rezisztencia fehérje kifejeződése jelentős mértékben növelte az EGFR autofoszforiláció gátlásához szükséges tirozin kináz gátló (Iressa) koncentrációját, erősen csökkentve ezáltal a szer citotoxikus hatásosságát.

Részt vettünk egy nagy érzékenységű HPLC-MS módszer kidolgozásában, amely lehetővé teszi a sejten belüli tirozin kináz gátlószerek mennyiségének direkt meghatározását.

K562, K562/MDR-1 és K562/ABCG2 modellsejtek segítségével beállítottunk egy összetett, több oldalú vizsgálati rendszert, amely segítségével előként mutattuk ki, hogy az új tirozin kináz gátlók közül az Src/Abl gátló bosutinib citotoxikus hatását egyik vizsgált multidrog fehérje sem függeszti fel.

Elsőként bizonyítottuk, hogy a szimpatikus idegrendszer termelte neurotranszmittereknek nem csak gátló, de stimuláló hatása is lehet az immunválaszra monocita-makrofág sejtekben. Összefüggést találtunk az ERK, p38 MAP kinázok aktivitásainak mértéke, időbeli lefutása és az isoproterenol stimulus függő immunmoduláló hatása között.

Elsőként írtuk le, hogy az isoproterenol makrofágokban is képes a beta adrenerg receptor PKA függő foszforilációján keresztül egy Gs/Gi „switch” létrehozására és ezáltal egy átmeneti ERK aktivációra. Megállapítottuk, hogy az isoproterenol előkezelés jelentősen csökkenti a MAP kinázok LPS hatására történő foszforilációját, amely egy új, eddig nem ismert mechanizmusa lehet a beta-adrenerg immunszupresszióknak.

## **A pályázati munka során módosult a munkában aktívan részt vevő kutatók személye.**

Apáti Ágota 2006 óta új kutatási területen dolgozik, amely sokban kapcsolódik eddigi munkánkhoz, de nem képezi ennek a pályázatnak a tárgyát. Brózik Anna PhD hallgató, aki teljes egészében ezen a témán dolgozott 2007 óta szülési szabadságon van. 2005-ben

csatlakozott csoportunkhoz Hegedűs Csilla, jelenlegi PhD hallgató, akinek eredményei sokban hozzájárultak a sikeres munkához. Magócsi Mária témavezető 2007 óta Londonban él. 2008-tól Apáti Ágota volt segítségére megbízott témavezetőként.

### **A pályázati munka során történt kisebb eltérés a munkatervtől.**

Finanszírozási problémák miatt 2006-2007 között nagyobb hangsúlyt kapott a társkutató Dr. Szelényi Judittal végzett kutatás a szimpatikus idegrendszer és az immunrendszer kapcsolatának területén, amelyből két publikáció is született. A 2008-tól előtérbe került az imatinib rezisztencia egyik igen fontos szereplőjének, a multidrog fehérjéknek és az új tirozin kináz gátlók kölcsönhatásának vizsgálata. Ezekből az eredményekről több nemzetközi konferencián és egy beküldött cikkben számoltunk be.

1. Brozik, A., Casey, N. P., Hegedus, C., Bors, A., Kozma, A., Andrikovics, H., Geiszt, M., Nemet, K., and Magocsi, M. (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1090**, 344-354
2. Schaefer, A., Kosa, F., Bittorf, T., Magocsi, M., Rosche, A., Ramirez-Chavez, Y., Marotzki, S., and Marquardt, H. (2004) *Cell Signal* **16**, 223-234
3. Janossy, J., Ubezio, P., Apáti, A., Magocsi, M., Tompa, P., and Friedrich, P. (2004) *Biochem Pharmacol* **67**, 1513-1521
4. Apáti, A., Janossy, J., Brozik, A., and Magocsi, M. (2003) *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 70-73
5. Bors, A., Ribiczey, P., Koblos, G., Brozik, A., Ujfaludi, Z., Magocsi, M., Varadi, A., Tordai, A., Kovacs, T., and Aranyi, T. (2008) *Anal Biochem* **372**, 261-263 Magyar szabadalmi bejelentés száma: P0600159
6. Elkind, N. B., Szentpetery, Z., Apáti, A., Ozvegy-Laczka, C., Varady, G., Ujhelly, O., Szabo, K., Homolya, L., Varadi, A., Buday, L., Keri, G., Nemet, K., and Sarkadi, B. (2005) *Cancer Res* **65**, 1770-1777
7. Hegedus, C., Szakacs, G., Homolya, L., Orban, T. I., Telbisz, A., Jani, M., and Sarkadi, B. (2009) *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 47-56
8. Szelenyi, J., Selmeczy, Z., Brozik, A., Medgyesi, D., and Magocsi, M. (2006) *Neurochem Int* **49**, 94-103
9. Ludanyi, K., Gogolak, P., Rethi, B., Magocsi, M., Detre, C., Matko, J., and Rajnavolgyi, E. (2004) *Cell Signal* **16**, 939-950
10. Magocsi, M., Vizi, E. S., Selmeczy, Z., Brozik, A., and Szelenyi, J. (2007) *Immunology* **122**, 503-513
11. Magócsi Mária, Apáti Ágota, Brózik Anna: *Calcium induced cell proliferation, survival and apoptosis in myelo-erythroid cells* Nemzetközi Membránkonferencia Sümeg Előadás, 2004
12. Brózik, A., Bors, A., Hegedűs, Cs. Apáti, Á. and Magócsi, M.: *Ca<sup>2+</sup>-induced non-terminal differentiation of erythro-leukemia cells reveals an essential role for ERK1/2 in hemoglobin production but not in limited cell division capacity*, közlés alatt, 2009
13. Brozik A, Casey NP., Bors A., Geiszt M., Nemet K., Magocsi M.: *Signalling mechanisms leading to erythroid differentiation of K562 cells with reduced Bcr-Abl function*, FEBS Journal 272. p443, 2005
14. Nahajevszky, S., Ádám É., Andrikovich H., Mikala G., Magocsi M.: *Imatinib kombináció hatása CML-BC basofil leukémiás meningitis formában jelentkező relapszusában*, díjnyertes pályázat (Novartis) Magyar Hematológusok Társasága, 2005



15. Nahajevszky, S., Magocsi M., Ádám É., Andrikovich H., Mikala G., Massi T.: *Effective treatment of the central nervous system in CML patient with the combination of imatinib mesylate and valproic acid*, Blood 106 (11) 301b-302b, 2005
16. Magócsi Mária, Hegedüs Csilla, Várkuti Boglárka, Brózik Anna: *Differentiation and apoptosis in CML cells*, Nemzetközi Membrankonferencia Sümeg **Előadás**, 2006
17. Csilla Hegedüs, Ágota Apáti, Katalin Német, András Váradi, Csilla Özvegy-Laczka, Balázs Sarkadi: *Modulatory effect of ABCG2 function on imatinib-induced erythroid differentiation and apoptosis in K562 cells* 2nd FEBS Special Meeting; ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases; March 1-8, 2008; Innsbruck, Austria
18. Hegedus, Cs., Özvegy-Laczka Cs, Apáti, Á., Magócsi, M., Német, K., Örfi, L., Kéri, Gy., Katona, M., Takáts, Z., Váradi, A., Szakács, G. and Sarkadi, B.: *Interaction of the second generation Bcr-Abl inhibitors nilatinib, dasatinib and bosutinib with the MDR1 and ABCG2 multidrug transporter* British Journal of Pharmacology. Elfogadva 2009.