

# XXXI. OTDK Biológia Szekció

Anginex és anginex foldamer, avagy hogyan  
gátoljuk a tumor növekedést a galektin-1-en  
keresztül?

Készítette: Makra Ildikó

Biológus MsC II. évfolyam

Pécsi Tudományegyetem, MTA Szegedi Biológiai Központ

Témavezető: Dr. Monostori Éva (MTA Szegedi Biológiai Központ,  
Genetikai Intézet)

Belső konzulens: Dr. Dénes Viktória (PTE Biológia Intézet, Kísérletes  
Állattani és Neurobiológiai Tanszék)

# Tartalomjegyzék

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Bevezetés.....                                                                                                        | 3  |
| I.1. A tumorokról általában.....                                                                                         | 3  |
| I.2. A galektin fehérje család.....                                                                                      | 3  |
| I.3. A galektinek szerepe a tumor fejlődésben.....                                                                       | 4  |
| I.4. A galektin-1 általános jellemzése.....                                                                              | 8  |
| I.5. A Gal-1 főbb funkciói és ezek összefüggése a tumorok fejlődésével.....                                              | 9  |
| I.4. Anginex, mint a galektin-1-et célzó terápiás szer a tumorgátlásban.....                                             | 10 |
| II. Célkitűzés.....                                                                                                      | 13 |
| III. Anyagok és módszerek.....                                                                                           | 14 |
| III.1. Egér nyirokcsomó sejtek izolálása.....                                                                            | 14 |
| III.2. A kísérletekben alkalmazott sejtvonalak főbb jellemzői.....                                                       | 14 |
| III.3. Proliferációs teszt.....                                                                                          | 15 |
| III.4. Statisztikai analízis.....                                                                                        | 16 |
| III.5. Oldatok készítése.....                                                                                            | 16 |
| IV. Eredmények.....                                                                                                      | 17 |
| IV.1. Az Anginex gátolja az endotél sejtek proliferációját.....                                                          | 17 |
| IV.2. Anginex analógok tervezése és hatékony alkalmazása a sejtek proliferációjának gátlásában.....                      | 18 |
| IV.3. Az anginex foldamer tervezése és eredményes alkalmazása bizonyos tumorsejtvonalak proliferációjának gátlására..... | 20 |
| V. Összefoglalás.....                                                                                                    | 24 |
| VI. Irodalomjegyzék.....                                                                                                 | 26 |
| VII. Köszönetnyilvánítás.....                                                                                            | 29 |

# **I.Bevezetés**

## **I.1. A tumorokról általában**

A rákkutatás gyors fejlődésével számos új információ került a kutatók kezébe, melyek segítségével a tumor folyamatok legjelentősebb lépéseit, tulajdonságait meghatározták, és a további kutatási irányvonalakat is felvázolták.

2000-ben Hanahan és Weinberg összegezte az addigi ismeretek alapján a rák legfőbb jellemzőit (Hanahan, 2000). Összesen hat sejtfiziológiai módosulást írtak le, melyek a korlátlan növekedést lehetővé teszik. Kezdetben a rákos sejtek genomjukban mutációkat szenvednek, az onkogének esetében funkció nyeréses, míg a tumor szupresszor gének esetében funkció veszteses mutációk révén a sejtek kikerülnek a sejtciklust szabályzó kontrol alól. Ennek következményeként a növekedési szignáloktól függetlenül, illetve a gátló szignálok jelenlétében egyaránt korlátlanul osztódnak ezek a sejtek. Osztódásuk után azonban egyaránt elkerülik a differenciálódást és a programozott sejthalált. Majd a már pár mm<sup>3</sup>-nél nagyobb tumorokban új vérerek jelennek meg, biztosítva a sejteknek szükséges oxigén és tápanyag ellátást. A primer tumorokból leváló sejtek pedig a környező szöveteket, vagy a vérárammal eljutva a távolabbi szöveteket is megtámadhatják, áttéteket kialakítva.

## **I.2. A galektin fehérje család**

A galektinek széles körben megtalálhatók az élővilágban (Danguy,2002). Ez idáig 16 különböző galektint azonosítottak, melyek elnevezése felfedezésük kronológiai sorrendje szerint történt (Stannard, 2010). Mindegyikük két közös jellemzője a  $\beta$ -galaktozidot tartalmazó cukrokhoz való affinitás, valamint a galaktozid-kötő helyet kialakító aminosavak hasonlósága (Barondes, 1994). Legalább egy szénhidrát felismerő domain-t (CRD) minden galektinben találunk, ami nagy affinitással köti a  $\beta$ -galaktozid tartalmú cukrokat (Rabinovich, 2005). A Galektin család tagjait szerkezetük alapján három típusba soroljuk (Hughes, 1999):

- az úgynevezett prototípusba tartozók, melyek csupán egy CRD-t tartalmaznak, legismertebb képviselőjük a humán galektin-1 (Gal-1)

- a tandem-ismétlődésű galektinek kettő különböző, de egymással homológ CRD-t tartalmaznak, melyet egy prolin-glycin gazdag linker kapcsol össze
- a kiméra típusú galektinek szintén egy CRD-vel és egy rövid glycin-tyrozin-glutamin-prolin gazdag ismétlődéseket tartalmazó farki részből állnak, jelenleg a második legkutatottabb galektin tartozik csak közéjük, a galektin-3 (Gal-3).

Citoplazmatikus proteinek tulajdonságait mutató fehérjék, mivel a transzportjukhoz szükséges szignál szekvenciákat nem tartalmaznak, nem glikoziláltak (Hughes 1999), továbbá N-terminálisuk acetilált (Clerch, 1988). Mégis szekretálódnak, azonban ez nem a szokványos endoplazmatikus retikulum-Golgi klasszikus útvonalon történik (Hughes 1999). Lokalizációjukat tekintve intracellulárisan, a sejtfelszínen és extracellulárisan egyaránt elhelyezkedhetnek. Sejten belül a citoplazmában illetve a sejtmagban, míg sejten kívül az extracelluláris mátrixhoz kötődve találhatók meg (Perillo, 1998).

A galektineknek fontos szerepük van az alapvető sejt szintű mechanizmusokban, mint a sejtek fejlődése, differenciációja, az RNS splicing, a sejt-sejt adhézió, a sejt- mátrix kölcsönhatások kialakítása, a növekedés szabályzás és az apoptotikus folyamatok (Danguy, 2002). Továbbá egészségügyi szempontból különösen fontos és nem elhanyagolható a patológiás elváltozások kialakulásában betöltött szerepük, különös tekintettel a tumoros folyamatokra.

### **I.3. A galektinek szerepe a tumor fejlődésben**

Ma már számos klinikai és kísérleti eredmény is bizonyítja, hogy a tumor képződés/fejlődés és a galektin expresszió között kapcsolat van. Ezeket különböző szervek normál, és tumoros szövetei által kifejezett galektinek relatív mennyiségének összehasonlításával igazolták. Mind a Gal-1 mind pedig a Gal-3 emelkedett expressziója megfigyelhető sok különböző daganat esetében összehasonlítva a normál szövetekben tapasztaltakkal. A máj, a gyomor, a pajzsmirigy, a petefészek, a prosztata, az izom és a központi idegrendszer tumoros elváltozásaiban a galektinek magasabb expressziója volt kimutatható a daganatos szövetekből, mint a normál szövetek esetében (Danguy, 2002).

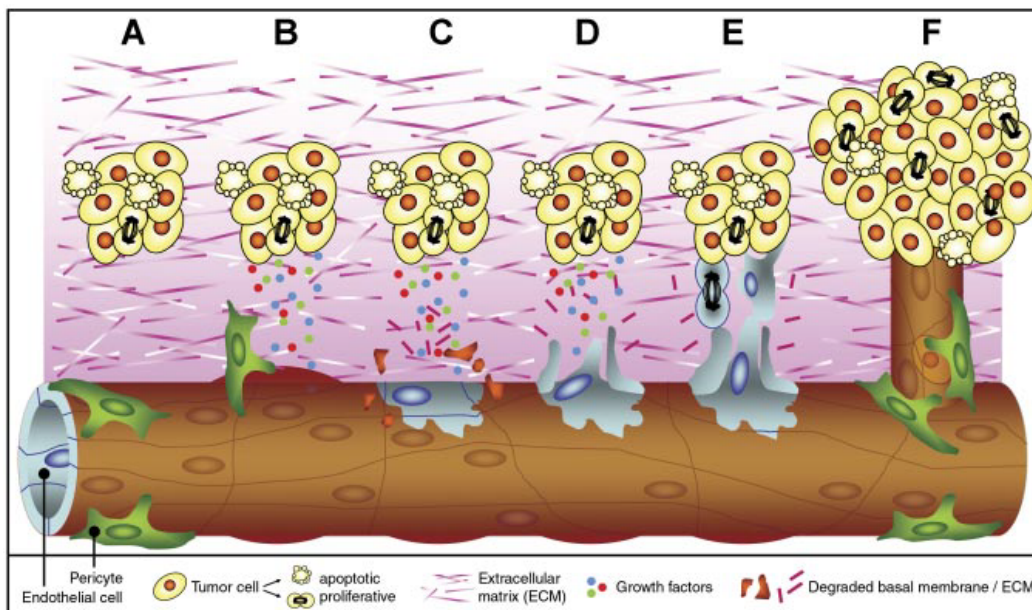
A többféle mechanizmus közül, melyekben a tumorfejlődés szempontjából fontos szereppel bírnak a galektinek, a legkiemelkedőbb a sejt adhézió kialakítása, a sejtnövekedés szabályozása, bizonyos sejtek programozott sejthalálának indukciója vagy gátlása (Danguy, 2002), továbbá az új erek képzésének serkentése (Thijssen, 2007).

#### **a) Proliferációra gyakorolt hatás**

A galektinek és sejtek proliferációjának kapcsolata tumor folyamatokban a Gal-1 közvetített endotél sejtek aktiválásával és osztódásuk serkentésével áll összefüggésben. A Gal-1 expresszió és növekedett endotél sejt proliferáció pozitív korrelációját alátámasztotta már 1990-ben Sanford és Harris-Hooker patkány tüdő artéria esetében (Perillo, 1998).

#### **b) Érképzés indukálása**

A szilárd tumorok fejlődésük kezdetekor serkentik új erek képződését is, az angiogenezist, amivel biztosítják a további növekedésükhöz szükséges tápanyag és oxigén ellátásukat (Thijssen, 2007). A pár mm<sup>3</sup>-es nagyságú tumorok körül kialakuló hipoxiás környezet hatására a tumorsejtek növekedési faktorokat szekretálnak, melyekkel aktiválják a környező erek endotél sejtjeit. Ezután a növekedési faktorok irányításával, többlépcsős folyamat révén jönnek létre az új, tumorszövetbe lépő erek (I.1. ábra). A Gal-1 és Gal-3 fehérjék fő szerepe ezen endotél sejtek proliferációjának, és migrációjának serkentése (Thijssen, 2007).



**I.1. ábra: A tumorok érképzésének sematikus ábrázolás:** A: a korlátlan növekedésű sejtek létrehozzák a primer tumort, B: az ereket stabilizáló periciták leválnak az érfalról, a tumor sejtek növekedési faktorokat termelnek, C-D: az aktivált endotél sejtek proteázok termelését kezdik, melyek bontják a bazális membránt és az extracelluláris mátrixot, E-F: megkezdődik az endotél sejtek osztódása és migrációja, mely folyamatot a növekedési faktor gradiens irányítja, kialakítva az új tumorszövetbe lépő ereket. A képet V. L.J.L. Thijssen et al (2007) cikkéből adoptáltam.

### c) Immunmódosító hatás

A tumorsejtek immunprivilegiumának biztosítása szintén elengedhetetlen a tumor fejlődéshez. Thijssen és munkatársai humán tumorok in vivo, és humán tumor sejtvonalak in vitro vizsgálata alapján kimutatták, hogy kapcsolat áll fenn a galektinek expressziója és a tumorok immunprivilegiumának kialakítása között. Továbbá fény derült arra is, hogy ebben az endoteliális galektinek is szerepet játszanak. A tumor sejtek indukálják ugyanis a tumor specifikus immunsejteknek tumor szövetbe való infiltrációját, azonban ehhez először át kell jutniuk az endotélén, amely a galektinek expresszáásával befolyásolja azok túlélését és funkcióját (Thijssen, 2007).

További kísérletek eredményei azt mutatják, hogy az intracelluláris Gal-3 képes gátolni a T-sejtek programozott sejthalálát (Perillo, 1998; Stannard, 2010), továbbá a T-sejtek aktivációját a T-sejt receptorral való komplex képzésével (Thijssen, 2007),

míg a szekretált Gal-1 az aktivált T-sejtek apoptózist indukálja (Kovács-Sólyom, 2009; Rubinstein, 2004). A két galektin ellenkező hatása a folyamatra arra utal, hogy összehangolt szabályozás révén felelősek a sejtek menekítéséért és apoptózisáért (Perillo, 1998).

#### **d) Sejt-sejt, sejt- extracelluláris mátrix kölcsönhatások kialakítása, metasztatikus képzés**

Az áttétek képzésében nagy szerepet kapnak a Gal-1 és a Gal-3 sejt-sejt, illetve sejt- extracelluláris mátrix kapcsolatok kialakításában és bontásában betöltött funkciói is (Perillo, 1998). Hiszen az adhézis kapcsolatok segítik a primer tumorból kijutó sejtek új helyen való megtapadását.

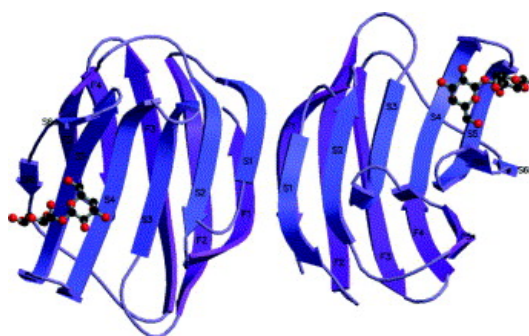
Többféle szövetben és sejt esetében tanulmányozták már a galektinek hatását, legtöbb információval a Gal-1-ről és Gal-3-ról rendelkezünk. Van den Brule és mtsai melanómáknál kimutatták, hogy a Gal-1 endolektinként befolyásolja a tumor sejt-laminin kölcsönhatás kialakulását, ezért a tumor invazivitását és metasztatikus hajlamát befolyásolja. A Gal-3 esetében egy francia kutatócsoport igazolta, hogy a Gal-3-ban gazdag extracelluláris vezikulumok csak a magas metasztatikus hajlamú melanómák esetében voltak megfigyelhetők (Danguy, 2002).

Számos epiteliális eredetű tumor, mint például a vastagbél és a tüdőrák esetében a Gal-1 és a Gal-3 expresszió szintén megfigyelhető volt. Míg a Gal-1 emelkedett expressziója ezekben a tumorokban a metasztatikus hajlam növekedésével szoros összefüggést mutatott, addig a tüdőrák esetében a Gal-3 csökkent expressziója mutatta ugyanezt az eredményt. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy bizonyos tumorok esetében a két galektin ellentétes hatással van a tumor agresszivitására és metasztatikus hajlamára (Perillo, 1998).

A 4T1 emlő karcinómával végzett kísérleteink is alátámasztják a metasztatikus hajlam és a Gal-1 expresszió közötti korrelációt (Szebeni, 2012).

## I.4. A galektin-1 általános jellemzése

Az első leírt galektin a galektin-1 fehérje, mely az úgynevezett prototípus szerkezettel rendelkezik (Hirabayashi, 1993). Egy homodimer molekula (I.2. ábra), amely két körülbelül 130 aminosavból álló, 14 kDa méretű globuláris egységből épül fel, melyet a bennük összerendeződő  $\beta$ -redő struktúrák hoznak létre (Barondes, 1994). Mindkettő alegység tartalmaz egy-egy  $\beta$ -galaktozid kötő helyet.



**I.2. ábra: A Gal-1 homodimer szerkezete**

(forrás: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604010782>)

A Gal-1 termelődését több normál és patológiás szövetben egyaránt kimutatták már, expressziója pedig az egyedfejlődés során változik (Perillo, 1998). Jelenlétét detektálták többek között a tímusz, a nyirokcsomók, a lép, a máj, a tüdő, a szív, a szaporító szervek szöveteiben, valamint mindhárom izomszövetben egyaránt. Több humán tumorban szintén kimutatták jelenlétüket, expresszálják a tumor sztróma elemei: tumor asszociált fibroblasztok, endotél és pericita sejtek, extracelluláris mátrix, továbbá maguk a tumor sejtek is (Pietras, 2010).

A Gal-1 számos fiziológiai és patológiai folyamatban szerepet vállal: sejt adhézió kialakítása (Thijssen, 2007) vagy gátlása (pl izom), immunmoduláció (Rubinstein, 2004), sejt proliferáció és migráció indukálás vagy gátlás (pl fehérvérsejtek) (Thijssen, 2010), valamint tumor transzformáció (Rabinovich, 2005).

Részt vesz az immunhomeosztázis szabályzásában a perifériás aktivált T-sejtek (Th1 típus) apoptózisán keresztül, mind a tumoros, mind a gyulladásos folyamatok során. A krónikus gyulladásokban a Th1 típusú választ eltolja a Th2 típusú sejtek aktivitásának irányába, ezáltal gátolva a gyulladásos citokinek (TNF- $\alpha$ ,

IFN- $\gamma$ ) szekrécióját (Rubinstein, 2004). Valamint egyaránt szerepe van a fiziológiás és a tumor sejtek immunprivilegiumának biztosításában (Rubinstein, 2004).

## **I.5. A Gal-1 főbb funkciói és ezek összefüggése a tumorok fejlődésével**

### **1) Endotél sejtek aktiválása, proliferációjuk, migrációjuk serkentése**

Serkenti az endotél sejtek aktiválódását, osztódását és migrációját, mely az új erek képzésének alapfeltétele. Ez a folyamat az egyik kezdő lépése a tumorok fejlődésének, ezáltal biztosítják a számukra megfelelő oxigén és tápanyag ellátását. A szilárd tumorok kezdetben növekedési faktorokat szekretálnak, melyekkel aktiválják az endotél sejteket új erek képzését indukálva (Thijssen, 2007), emellett az endotél sejtek Gal-1 emelkedett expresszióját is eredményezi (Thijssen, 2010). Humán köldökzsinór vénából izolált endotél sejteken végzett in vitro kísérletekkel alátámasztották, hogy a Gal-1 az aktivált endotél sejtek egyik fontos markere, in vivo pedig növekvő expressziója arányos az endotél sejtek aktivációjával (Thijssen, 2007; Thijssen, 2006).

A tumor fejlődésben betöltött szerepét igazolja, hogy a Gal-1 knock-out egerekben a tumor angiogenezis hibás, azonban, ha Gal-1-et magasan expresszáló tumorról oltották be őket az angiogenezis kevésbé gátlódott. Tehát az endotél sejtek a környezetükből felvett, jelen esetben a tumor sejtek által szintetizált Gal-1-et is képesek hasznosítani. Továbbá ezek az eredmények azt is bizonyítják, hogy a tumor sejtek képesek Gal-1 szekrécióra ezzel támogatva a tumor progressziót (Thijssen, 2010).

### **2) Immunprivilegium biztosítása**

Az immunsejtek homeosztázisát számos galektin befolyásolja, ezek közül a Gal-1-nek különösen jelentős szerepe van ezekben a folyamatokban. A Gal-1 többek között gátolja a T-sejtek növekedését és az aktivált T-sejtek apoptózisát indukálja (Stannard 2010; Kovács-Sólyom, 2009; Rubinstein, 2004)

Mivel a tumorok korlátlan növekedésének elengedhetetlen feltétele a sejtek immunrendszerrel való menekítése, ezért a Gal-1 tumor specifikus T-sejtekre gyakorolt hatása alapvető fontossággal bír ennek biztosításában. A programozott sejthalál szabályzásában betöltött szerepét alátámasztják a csoportunk által végzett melanómán és gliómán végzett ko-kultúrák kísérletek. A Gal-1-et expresszáló

melanóma illetve glióma tumor sejtvonalatokat egészséges aktivált T-sejtekkel kóltúrában növesztve jelentős T-sejt apoptózist tapasztaltunk. Míg, jelentős apoptózis csökkenést mutattak ugyanezen tumor sejtvonalakkal a Gal-1 eltávolítása után végzett kísérletek (Kovács-Sólyom, 2009).

### **3) Sejt-sejt, sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok kialakítása**

A metasztázisok kialakulása számos sejt-sejt, sejt-extracelluláris mátrix átalakulást igényel, ezért a sejt-sejt és a sejt-extracelluláris kapcsolatok kialakításának, legnagyobb jelentősége tumorok esetében a primer tumor szövetből kiszabaduló sejtek új szövetben való megtapadásában rejlik. Tehát a tumorok áttétképezésével szorosan összefügg a Gal-1 sejtkecsolatok kialakításában betöltött szerepe. Hiszen a Gal-1 segíti a primer tumorból leváló sejtek extracelluláris mátrixhoz, valamint az endotél sejtekhez való adhézióját (Rabinovich, 2005).

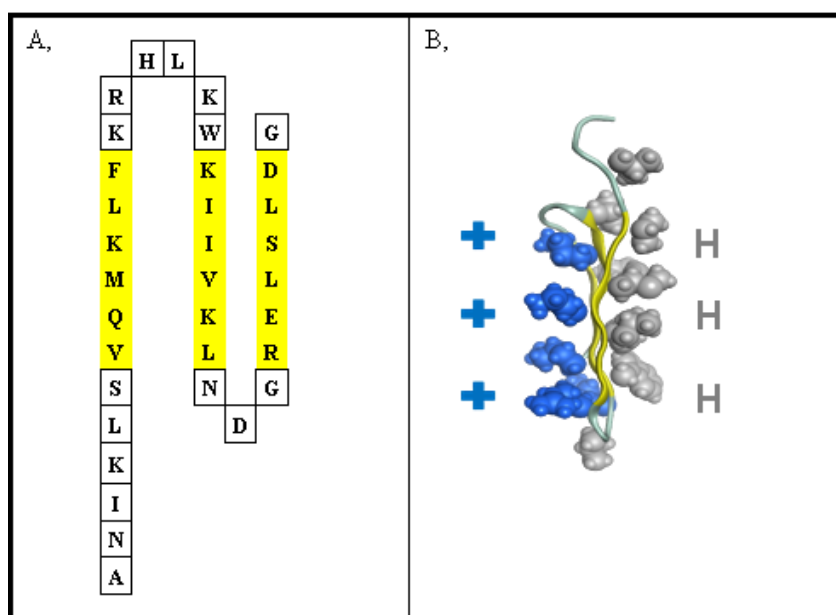
Csoportunk a mesenchimalis őssejtekkel (MSC) végzett kutatások során bizonyította, hogy a 4T1 emlő karcinóma áttétképezését a tüdőben a vad típusú MSC-k szignifikánsan serkentették, míg a Gal-1 knock-out MSC-k ezeket a paramétereket nem változtatták meg a csak emlő tumorral oltott egerekhez képest (Szebeni, 2012).

## **I.4. Anginex, mint a galektin-1-et célzó terápiás szer a tumorgátlásban**

A magasan vaszkularizált tumorok rossz klinikai prognózzal párosulnak, nem csak a kontrollálatlan tumor növekedés miatt, hanem az erekhez való könnyebb hozzáférhetőség következtében megnövekedett metasztatikus potenciáljuk miatt is (Dings, 2003). Ezek alapján az angiogenezist gátló hatóanyagok kidolgozása jó irányvonalat jelentett a tumor fejlődés gátlására. A tumor endotél sejtek könnyen hozzáférhetőek a terápiás szerek bejuttatása szempontjából, valamint tumor típustól függetlenül alkalmazható targetként szolgálnak. Azonban a terápiás szernek el kell különítenie a patológiás endotél sejteket az egészségestől. Mivel a tumor-asszociált erek endotél sejtjei, szemben az egészséges erek endotél sejtjeivel, nagy mennyiségű Gal-1-et termelnek, ezért a Gal-1 jó célpontnak bizonyulhat (Ito,2011; Thijssen, 2007; Mathieu 2007). Mivel a Gal-1 jelentős funkciót tölt be az angiogenezis folyamatában, továbbá a tumor és a tumor endotél sejtek egyaránt magasabban expresszálják a

normál endotél sejteknél, ezért megfelelő targetként tekintették a terápiás szerek alkalmazásához.

Az angiogenezis gátlására Kevin H. Mayo és csoportja szintetizált egy 33 aminosavból álló mesterséges oligopeptidet, az anginexet. Tervezése más endogén anti-angiogén fehérjék, mint az interleukin-8, trombocita faktor-4 szekvenciája és három dimenziós struktúrája alapján történt (Kevin H. Mayo, 2001; Schaft, 2002).



**I.3. ábra: Az anginex szerkezete** Dr. Martinek Tamás és Hegedűs Zsófia alapján.

A, az anginex szerkezeti rajza, a sárgával jelölt aminosavak a  $\beta$ -redő kialakításában vesznek részt (Kevin H. Mayo, 2001) B, az anginex oldalnézetből az amfifil jellegét kialakító hidrofób(+) és hidrofil (H) oldalláncaival

Az anginex ezekhez a fehérjékhez hasonló  $\beta$ -redő szerkezettel rendelkezik, melynek jelentőséget tulajdonítanak az anti-angiogén hatásban (I.3. ábra). Az *in vitro* hatóanyag tesztelés során kimutatták, hogy az anginex hatása az aktivált és tumor endotél sejtekre specifikus volt, mégpedig azok migrációjának gátlásán, és későbbi apoptózisának indukálásán keresztül (Schaft, 2002).

Később élesztő két hibrid rendszer segítségével, anginex kezelt endotél sejtek kettős festésével, valamint NMR spektroszkópiával is igazolták, hogy az anginex célmolekulája a Gal-1 fehérje (Thijssen, 2006). A két molekula interakciójából arra következtettek, hogy a Gal-1 az angiogenezist gátló anginex receptora. Ezért Gal-1 deficiens és vad típusú egereken is megvizsgálták az anginex hatását. A vad

típusúaknál a tumor növekedés gátlódott a kezelésre, míg a GAL-1 knockout egerek esetében nem fejtett ki hatást a tumor növekedésére, valamint nem befolyásolta az infiltráló immunsejtek számát sem. Ez a bizonyíték arra, hogy a Gal-1 alkalmas az angiogenezist gátló terápia célmolekulájának, valamint hogy az anginex a Gal-1-en keresztül fejt ki ezt a hatását.

Az anginex in vivo alkalmazásának optimalizálására irányuló vizsgálatok során MA148 petefészek karcinóma xenograft modellen kimutatták, hogy az anginex dózis függően egyaránt gátolja a tumorok növekedését, valamint a már meglévő tumorok további fejlődését (Dings, 2003).

## II. Célkitűzés

Az erősen vaszkularizált tumorok rossz klinikai prognózisa miatt az angiogenezis gátlásán alapuló módszerek kidolgozása ígéretes irányvonalat képeznek a rákterápiában. Nem elhanyagolható tény az sem, hogy a Gal-1 növekvő szintje a tumorok egyre rosszabb prognózisát eredményezi. Mivel a Gal-1-et a tumor sejtek és/vagy a tumorsztróma elemei is kifejezik, valamint az angiogenezisben is szerepet játszik, ezért jó targetként szolgál a terápiás kezelésekhez.

Munkánk során olyan, feltételezésünk szerint a Gal-1 angiogén funkcióját gátló, hatóanyag kidolgozását tűztük ki célul, mely értékes jelölt lehet a rákterápiában.

A hatóanyagokat az SZTE Gyógyszerkémiai Intézetéből Dr. Martinek Tamás és munkatársai szintetizálták meg, míg csoportunk ezek biológiai tesztelését végezte. Kiindulásként az antiangiogén hatású anginex molekulát vettük, mely bizonyítottan a tumor asszociált erek endotél sejtjeinek Gal-1-én keresztül fejt ki hatását. Az anginex:

- szerkezete alapján készültek el az anginex analógok, ezek az anginexszel megegyező  $\beta$ -redő struktúrával rendelkeznek, melynek az antiangiogén hatásban jelentőséget tulajdonítanak
- egy kisebb szakaszát reprezentáló mimetikumot is szintetizáltak- ez az anginex foldamer (AnxF) molekula-, amely annak töltéseloszlását reprezentálja, bár szerkezete és mérete teljesen eltér az anginexétől.

Célunk volt a megszintetizált molekulák endotél sejtekre gyakorolt hatásának összehasonlítása, ezáltal megállapítani melyik a legalkalmasabb a további kutatások folytatásához.

### III. Anyagok és módszerek

#### III.1. Egér nyirokcsomó sejtek izolálása

Cervikális diszlokációval feláldozott hat-hetes nőstény BALB/c egerek inguinális és mezenterialis nyirokcsomóit 10 % magzati borjú szérummal (FCS, Gibco, Invitrogen) kiegészített RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen) tartalmú petri csészében homogenizáltuk, majd a sejtuszpenziót nagyobb szövetdaraboktól mentesen átszívtuk egy tiszta Falcon csőbe, majd 50µl sejtuszpenzióhoz 450µl tripánkéket adva Bürker-kamrában megszámloltuk a sejteket. Az állatokkal a hatályos jogszabályoknak megfelelően, állatkísérleti engedéllyel dolgoztunk.

#### III.2. A kísérletekben alkalmazott sejtvonalak főbb jellemzői

| SEJTEK           |                           |              |              |               |             |                |
|------------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|-------------|----------------|
| egér             |                           |              | humán        |               |             | egér           |
| fiziológiás sejt | immortalizált fiz. sejtek |              | melanóma     |               |             | emlő karcinóma |
| LN blaszt        | H5V                       | bEnd3        | B16/F10      | SKMEL-28      | HT144       | 4T1            |
| KRPMI 10% FCS    | DMEM 10% FCS              | DMEM 10% FCS | RPMI 10% FCS | KRPMI 10% FCS | MEM 10% FCS | KRPMI 10% FCS  |

Vizsgálatainkat egér illetve humán eredetű tumor sejtvonalakon, illetve egér immortalizált endotél sejteken végeztük. Továbbá annak érdekében, hogy lássuk a szervezet normál fiziológiás sejtjeire milyen hatással vannak az alkalmazott hatóanyagok egérből izolált nyirokcsomó sejteket is teszteltünk.

Egér tumorsejtek közül a B16-F10 melanóma és 4T1 emlő karcinóma sejteket, valamint az egérből izolált perifériás nyirokcsomó sejteket penicillin/streptomocinnal (100 IU és 100 µg/ml), L-glutaminnal (2 mM) és 10 % újszülött borjú szérummal (FCS, Gibco, Invitrogen) kiegészített RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen) szövettenyésztő médiumban növesztettük. A H5V szív kapilláris endotél és a bEnd.3 agyi endotél sejteket valamint a csontvelői mesenchymalis őssejteket (MSC) penicillin/streptomocinnal, L-glutaminnal (2 mM) és 10 % FCS-sel kiegészített DMEM médiumban tartottuk fenn. A HT144 humán melanóma sejteket pedig az előzőekben leírt módon kiegészített MEM médiumban. A sejtvonalakat továbbá 5 % CO<sub>2</sub> -ban 37 °C-on, inkubátorban helyeztük el a kísérletek ideje alatt.

### III.3. Proliferációs teszt

A használt sejttípusokból a kísérlethez megfelelő sejtszám titrálás után a következő mennyiségeket vettük:

| Sejtek                          | sejtszámok<br>(db)/ lyuk |
|---------------------------------|--------------------------|
| T-sejtek                        | 3000                     |
| H5V<br>(szívkapilláris endotél) | 1500                     |
| bEnd.3<br>(agyi endotél)        | 1000                     |
| B16/F10<br>(egér melanóma)      | 5000                     |
| SKMEL-28<br>(humán melanóma)    | $1,1 \cdot 10^4$         |
| HT144<br>(humán melanóma)       | 9000                     |
| 4T1<br>(egér emlő karcinóma)    | 6000                     |

A különböző koncentrációban alkalmazott hatóanyagok hatásaként a sejtek proliferáció változását vizsgáltuk XTT módszerrel, minden koncentrációnál három párhuzamost alkalmazva. A sejteket 96 lyukú Costar sejtenyésző lemezen kezeltük. Az angonex tesztelését H5V illetve bEnd.3 sejteken, míg az analógokkal csak a második sejtvonalon végeztünk vizsgálatot minden esetben 3 napos inkubációs idővel, kontrollként pedig a molekulák oldására használt DMSO-t (dimetil- szulfoxidot; Sigma D2650) használtuk.

Az AnxF-t az egyes sejtek esetében 150, 100, 75, 50, és 25  $\mu$ M-os koncentrációkban alkalmaztuk 24 órás inkubáció mellett, kontrollként pedig az oldására használt Hepes/NaCl szolgált, mely 10mM Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) és 150mM NaCl 1mM-os oldata.

Az inkubációs idő leteltével 50-50  $\mu$ l frissen elkészített XTT-t adtunk a mintákhoz, és sejttípustól függően további 1-4 órán át inkubáltuk XTT-vel a sejtekkel. Az inkubáció alatt a hozzáadott XTT-ben levő tetrazólium sót a metabolikusan aktív sejtek mitokondriális dehidrogenázaikkal spektrofotometriásan mérhető formazánná alakítják, amelynek mennyisége arányos a sejtszámmal. Összehasonlíthatóvá teszi az

azonos sejtszámokból kiinduló kísérletek során tapasztalható proliferáció változásokat. Az optikai denzitások mérése Thermo / LabSystems Multiskan RC Microplate Reader-rel 450 nm hullámhosszon történt, melynek kezeléséhez EMS Reader szoftvert használtunk.

### **III.4. Statisztikai analízis**

Statisztikai számításainkat Microsoft Office Excel (2003) programmal végeztük el. Kétszélű, kétmintás, egyenlő varianciájú Student-féle t-tesztet alkalmaztunk, a szignifikancia szintet a következő módon határoztuk meg: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

IC 50 érték számítással azt a hatóanyag koncentrációt határoztuk meg, amely a sejtek felénél okozott proliferáció gátlást.

### **III.5. Oldatok készítése**

Tripánkék oldat sejtyszámoláshoz:

0,16 % (w/v) tripánkék (Reanal)

0.9 % NaCl desztillált vízben (Merck)

50ml DPBS készítése

5ml 10x PBS

10ml Milli-Q ioncserélt víz

5mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

6,6mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

50ml-ig feltölteni Milli-Q ioncserélt vízzel mérőhengerben

5mM PMS (fenazin metosulfát)

2mg PMS (Sigma P9625)

1307ul DPBS

XTT oldat

1mg/ml XTT (Sigma X4626) oldat készítése DPBS-ben

10 percig 37°C-on inkubálás vízfürdőben

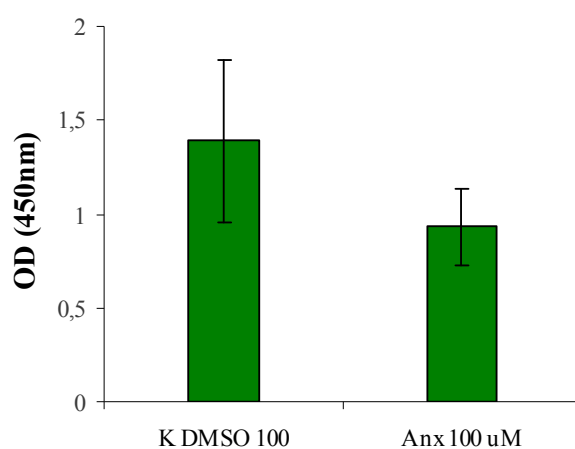
250  $\mu\text{M}$  PMS

## IV. Eredmények

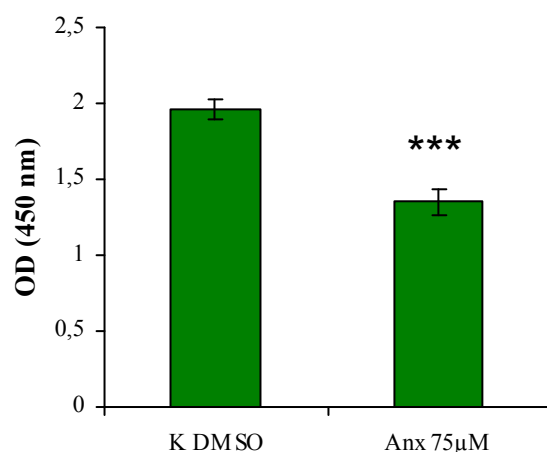
### IV.1. Az Anginex gátolja az endotél sejtek proliferációját

Az anginex gátló hatását a sejtek proliferációjára két egér eredetű endotél sejtvonalon teszteltük. A kísérletek során XTT módszerrel vizsgáltuk a sejtek osztódásának változását. A két alkalmazott sejtvonal eltérően reagált az anginex kezelésre.

A szívkapilláris endotél (H5V jelű) esetében a 100  $\mu$ M koncentrációban hozzáadott anginex nem gátolta szignifikánsan a sejtek proliferációját (IV.1. ábra).



**IV. 1. ábra: Az anginex hatása H5V sejtek proliferációjára:** A három napos inkubáció után mért párhuzamos minták optikai denzitásainak átlaga, szórásokkal feltüntetve.



**IV.2. ábra: Az anginex hatása bEnd.3 sejtek proliferációjára:** A három napos inkubáció után mért párhuzamos minták optikai denzitásainak átlaga, szórásokkal feltüntetve. A három \*-gal jelölt érték a t-teszt alapján  $p < 0,001$  szignifikanciát jelent.

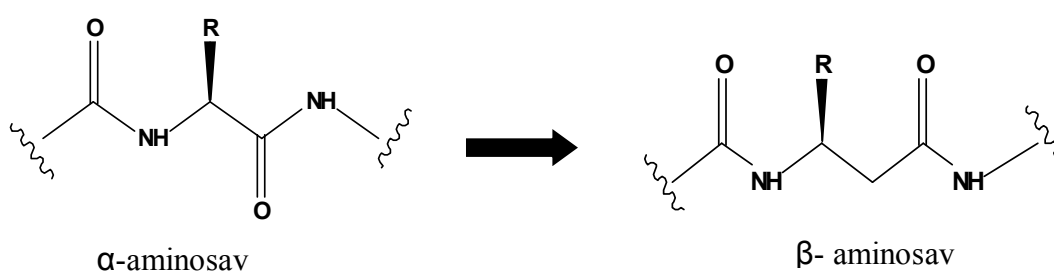
A bEnd.3 sejtek 75  $\mu$ M-os anginex koncentráció mellett 25%-os gátlást mutattak, mely a t-teszt alapján szignifikáns (IV.2. ábra).

A kísérletek során szembesülnünk kellett azzal a ténnyel, hogy az anginexet nem tudjuk hatékonyan alkalmazni rossz oldékonysága miatt. További problémát jelentett, hogy a kísérletekben alkalmazott DMSO oldószer önmagában már proliferáció gátlást okozott a sejteknél. Az anginex nagy hátránya ezeken felül, in vivo rövid féléletideje a peptidázok aktivitása következtében.

#### IV.2. Anginex analógok tervezése és hatékony alkalmazása a sejtek proliferációjának gátlásában

Az anginexnél tapasztalt hátrányos tulajdonságok miatt csoportunk, együtt működésben a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetéből Dr. Martinek Tamással és csoportjával, olyan anginex analógok kifejlesztését folytatja, melyek megtartják az anginex funkcionális tulajdonságait, viszont ellenállóbbak az enzimaktivitással szemben. A Gyógyszerkémiai Intézetben megszintetizált hatóanyagok biológiai tesztelését végzi csoportunk.

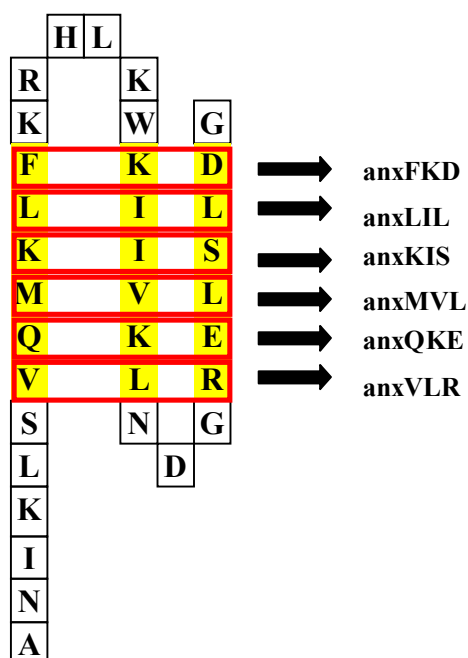
A kedvezőbb biológiai hasznosulás céljából tervezett analógok az anginex szerkezeti tulajdonságai alapján lettek megszintetizálva. Az anginex  $\beta$ -redőben térben szomszédosan elhelyezkedő  $\alpha$ -aminosav hármask  $\beta$ -aminosav-ra történő cseréjével igyekeztek áthidalni a problémát (IV.3. ábra).



#### IV.3. ábra: $\alpha$ -aminosavak cseréje $\beta$ -aminosavakra az analógok szintézise során

A  $\beta$ -aminosavak eggyel több C atomot tartalmaznak gerincükben, azonban a helyettesített  $\alpha$ -aminosavakkal megegyező oldalláncokkal rendelkeznek, ezzel biztosítva, hogy az anginex szerkezetével megegyező molekulákat kapjunk.

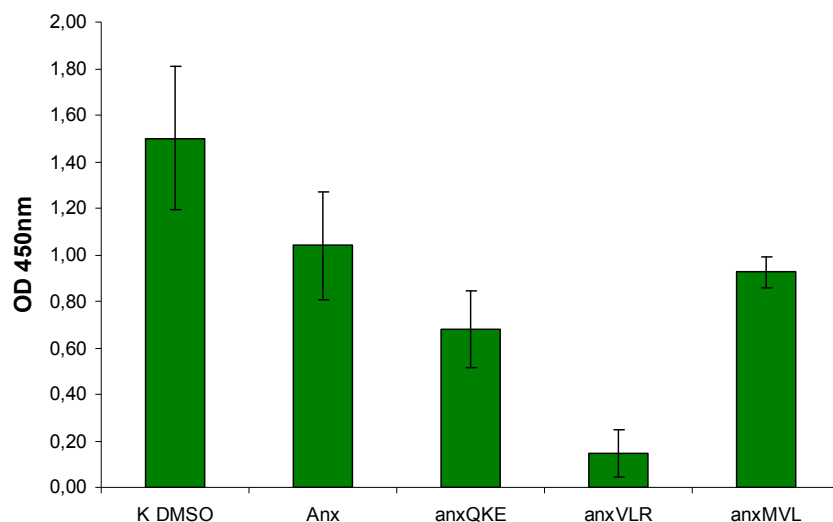
Az összes  $\beta$ -redőben térben szomszédosan elhelyezkedő aminosav hármas cseréjét követően hat különböző analógot kaptunk (IV.4. ábra).



**IV.4. ábra: Az aminosav hármasok cseréjével kapott analógok szerkezete.** Hegedűs Zsófia alapján. A piros téglalapok jelzik az egyszerre módosított aminosavakat. Az analógok nevüket a kicserélt aminosav hármasok után kapták.

Az aminosav csere előnye, azon felül, hogy az analógok ellenállóbbak a proteázokkal szemben, hogy a  $\beta$ - aminosavak szerkezeti eltérése nem bontja meg sem a  $\beta$ -redő struktúrát, sem az eredeti molekula felületi töltéseit nem változtatja meg.

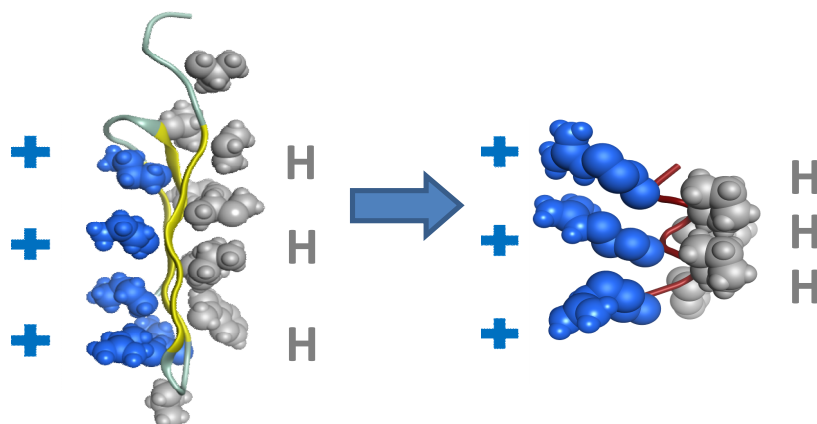
Az analógok tesztelését az anginex esetében is szignifikáns proliferáció gátlást mutató bEnd.3 sejteken végeztük el 100 $\mu$ M-os hatóanyag koncentrációt alkalmazva. A kapott eredmények alapján az anginex és mindhárom analóg eredményesen gátolja az endotél sejtek proliferációját (IV.5. ábra). Az anginexhez hasonló mértékben gátoltak az anxMVL és az anxQKE analógok, míg az anxVLR az összesnél hatékonyabbnak bizonyult. A további analógok szintézise és tesztelése még folyamatban van, de az eddig rendelkezésre álló eredmények alapján a  $\beta$ -aminosav csere hatékony megoldásnak bizonyult, hiszen a kapott eredmények alapján nem csak az *in vivo* alkalmazásukat könnyítené meg, hanem hatékonyabb molekulák létrehozását is lehetővé teheti. Reményeink szerint az anginex analógok, endotél sejtekre gyakorolt hatásuk révén, alkalmazhatóak lehetnek a tumor terápiában.



**IV.5. ábra:** Az anxQKE, anxVLR és anxMLV analógok bEnd.3 sejtekre gyakorolt proliferáció gátlása. A három napos inkubáció után mért párhuzamos minták optikai denzitásainak átlaga, szórásokkal feltüntetve.

### **IV.3. Az anginex foldamer tervezése és eredményes alkalmazása bizonyos tumorsejtvonalak proliferációjának gátlására**

Az anginex hátrányainak kiküszöbölésének másik megoldása egy az anginex alapján megtervezett mimetikum, az anginex foldamer (AnxF) alkalmazása. Ez a módszer a fehérje alapú gyógyszergyártás új eszköze, az eredeti hatóanyagok fizikai-kémiai tulajdonságait utánzó, kisebb és könnyebben alkalmazható hatóanyagok létrehozását teszi lehetővé.

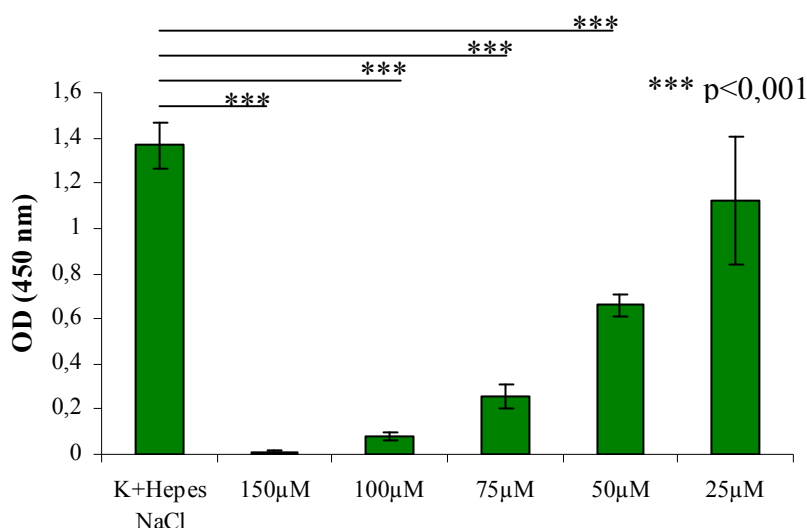


**IV.6. ábra:** Az anginex alapján szintetizált mimetikum, az AnxF szintézisének elvi háttere, szerkezeti felépítése. Dr. Martinek Tamás alapján. Az ábra bal oldalán a

$\beta$ -redő szerkezetű anginex molekula szerkezeti rajza látható, a pozitív (+) és hidrofób (H) oldalláncok által kialakított töltéseloszlás feltüntetésével. A jobb oldalon a megszintetizált foldamer molekula szerkezeti rajza a töltéseloszlások feltüntetésével.

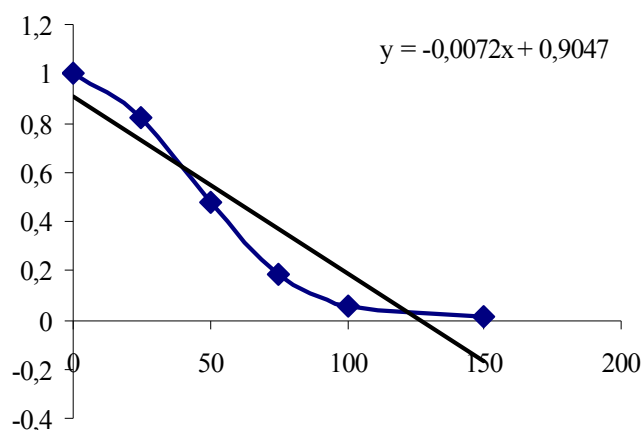
Az AnxF egy nyolc  $\beta$ -aminosavból felépülő, az anginex egy kisebb szakaszát reprezentáló molekula, mely az anginex  $\beta$ -redő szerkezetével ellentétben  $\alpha$ -helix szerkezetű, ennek ellenére reprezentálja az anginexre jellemző amfifil jelleget (IV.6. ábra).

Az AnxF-rel végzett kísérleteink során 150 - 25  $\mu$ M -os koncentráció tartományban alkalmaztuk a hatóanyag mennyiségét, majd a 24 órás inkubáció letelte után XTT módszerrel mértük a párhuzamos minták optikai denzitását, ezek átlagát pedig diagramon ábrázoltuk (IV.7. ábra), kontrollként a foldamer hígítására használt Hepes/NaCl-ot használtuk.



**IV. 7. ábra: A 4T1 sejtek proliferációjának gátlása AnxF-rel.** A sejteket 150, 100, 75, 50 illetve 25 $\mu$ M koncentrációjú AnxF-rel inkubáltuk együtt 24 órán át, majd XTT hozzáadása után az átalakított formazán mennyiséget optikai denzitás méréssel állapítottuk meg. A diagramon az eredmények átlagát a hozzájuk tartozó szórásokkal tüntettük fel.

Az átlagokból pedig kiszámítottuk az adott sejtek IC 50 értékét (IV.8. ábra), ez alapján össze tudtuk hasonlítani a foldamer hatékonyságát a különböző sejtvonalakon (IV.9. ábra).

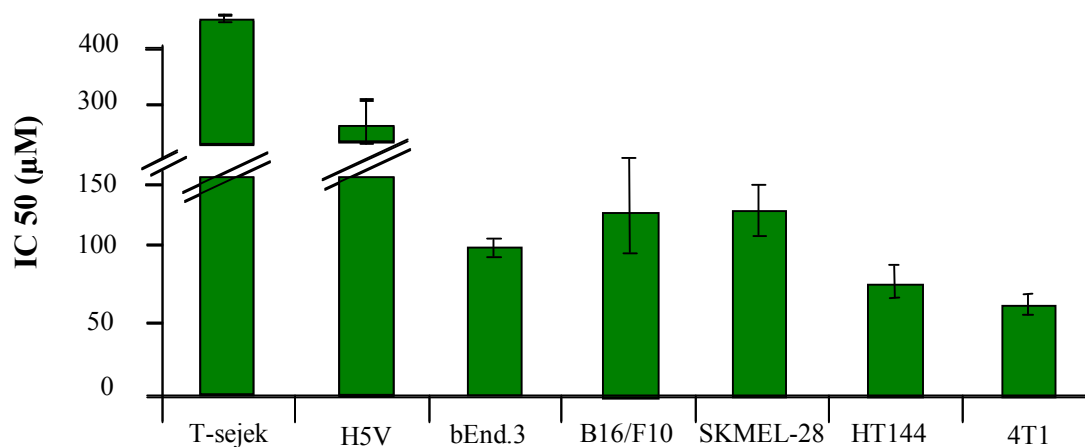


#### IV. 8. ábra: IC 50 érték meghatározásának bemutatása 4T1 sejteken

A különböző koncentrációkhoz kapott átlag értékeket elosztottuk a kontrolnál kapottal, majd ezt pont diagramon ábrázoltuk, melyre trendvonalat illesztettünk. A trendvonal egyenletéből ( $y=ax+b$ ) behelyettesítve a megfelelő értékeket az  $IC_{50}=(0,5-b)/a$  képletbe,  $\mu M$ -ban megkaptuk az AnxF adott sejtre vonatkozó IC 50 értékét.

Az AnxF tesztelését elsőként az angineknél is alkalmazott H5V endotél sejtvonalon végeztük el, valamint egérből izolált perifériás nyirokcsomó sejteken. Az egy napos kezelést követően a nyirokcsomó sejtek, valamint a H5V sejtek esetében sem tapasztaltunk proliferáció gátlást. Mivel a H5V sejteknél sem az anginekhez hasonló eredményt kaptuk, ezért egy másik endotél sejtvonalon is megvizsgáltuk hatását. A bEnd.3 sejteken elvégzett tesztek során azonban jelentős gátlást okozott a foldameres kezelés. Tehát beigazolódott, hogy bizonyos endotél sejtek proliferációját az AnxF is gátolni tudja (IV.9. ábra).

A későbbiekben felmerült annak a kérdése is, vajon a tumorsejteket gátolja-e a foldamer, és ha igen milyen mértékben. Ezért először a 4T1 sejtvonalon teszteltük hatását, amelynél jelentős gátlást tudtunk kiváltani a kezeléssel. A 4T1 esetében kapott eredmény bizakodásra adott okot, ezért további egér illetve humán eredetű tumor sejtvonalak tesztelését terveztük meg. A későbbiekben ezért melanóma sejtvonalakon is elvégeztük a kísérleteket. Míg a B16/F10 és az SKMEL-8 esetében nem tapasztaltuk a remélt hatást, addig a HT144 -nél hatékony volt szintén a kezelés (IV.9. ábra).



**IV.9. ábra: A különböző sejtek IC 50 értékei**

A foldamer, eddigi vizsgálatainak eredményei alapján, mindenképpen előnyös tulajdonsága, hogy nem fejt ki proliferáció gátló hatást a perifériás T-sejtekre. A tumor sejtvonalak esetében a 4T1 sejtekre volt a leghatékonyabb gátló hatással, de a HT144 humán melanómán is igen eredményesnek bizonyult. Ezek alapján bizakodásra ad okot, hogy a foldamer bizonyos tumor típusok esetében, mint a 4T1, és a HT144 célzottan tumor specifikus kezelések kifejlesztésére alkalmas lehet.

## V. Összefoglalás

A rákkutatás eddigi eredményei alapján a tumor angiogenezis gátlásán alapuló hatóanyagok kifejlesztése ígéretes irányvonal a terápiás kezelések kifejlesztéséhez. Mivel a tumor szöveti elemei fokozottan expresszálják a Gal-1 fehérjét, valamint nagymértékben hozzájárul a tumorok fejlődéséhez, ezért jó targetként szolgálhat az antiangiogén hatóanyagok számára. Ezek alapján az angiogenezist célzó mesterséges hatóanyagot, az anginexet, fejlesztették ki, mellyel sikeresen gátolták a tumorok fejlődését in vitro és in vivo kísérletekben egyaránt. Később bebizonyították, hogy az anginex a Gal-1 fehérjéjén keresztül gátolja a tumorokkal asszociált, angiogén faktorok által aktivált endotél sejtek osztódását, így akadályozva új erek kialakulását.

A csoportunk által elvégzett in vitro anginex kezelések a bEnd.3 sejteken igazolták az irodalomban közölt adatokat, miszerint az anginex gátolja az endotél sejtek proliferációját. Azonban azzal a problémával szembesültünk, hogy az anginex oldásához használt DMSO önmagában is gátolja a sejteket, valamint az anginexet nem tudtuk hatékonyan alkalmazni rossz oldékonysága miatt.

Az anginex esetében problémát jelent in vivo rövid féléletideje (a szervezetben található peptidáz aktivitás miatt), ezért olyan anginex analógok kifejlesztését folytatjuk, melyek megtartják az anginex funkcionális tulajdonságait, azonban ellenállóbbak az enzimaktivitással szemben. Az analógok szintézisét, illetve biológiai tesztelését a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetéből Dr. Martinek Tamás csoportjával együttműködésben végeztük. Az anginex  $\beta$ -redő struktúrájában elhelyezkedő  $\alpha$ -aminosavak  $\beta$ -aminosavra történő cseréjével hat különböző analóg megtervezése történt, melyek közül hármat biológiai tesztnek is alávetettünk. Az anginex, és a három analóg (anxQKE, anxMVL, anxVLR) hatását bEnd.3 sejteken vizsgáltuk. Mindegyik gátló hatást mutatott a proliferációra, azonban az anxVLR bizonyult a leghatékonyabbnak. Ezek alapján az aminosav csere nem csak az in vivo alkalmazásukat könnyítené meg, hanem hatékonyabb molekulák létrehozását is lehetővé teheti. Az endotél sejtekre gyakorolt hatásuk révén gátolni lehet a tumorok növekedését in vivo, mely hatást tovább erősítheti, ha tumorsejteket közvetlenül targetáló kemoterápiás szerekkel együtt kombinált terápiában alkalmazzuk.

Egy másik lehetőség a hatékonyabb molekulák tervezésére a mimetikumok használata, melyek az eredetinel kisebb és könnyebben alkalmazható molekulák,

valamint az eredeti hatóanyag fiziko-kémiai tulajdonságait utánozzák. Az anginex alapján ezzel a módszerrel megszintetizált ilyen mimetikum az AnxF. Ez a molekula az anginex egy kisebb szakaszát reprezentálja, valamint amfifil jellegét. A foldamerrel végzett kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy nincs gátló hatással a perifériás T, valamint a HSV sejtekre, azonban a bEnd.3-ra igen. Tumor sejtvonalak tesztelése után az is nyilvánvalóvá vált, hogy míg bizonyos tumor sejteknél (B16/F10, SKMEL-28) csak nagyobb koncentrációban hatékony, addig mások (4T1, HT144) osztódását már kisebb koncentrációban is gátolja. Ezeknél a tumoroknál alkalmas lehet akár a tumor specifikus kezelések kifejlesztésére.

## VI. Irodalomjegyzék

S.H. Barondes, D.N.W. Cooper, M.A. Gitt, H. Leffler (1994) Galectins, Structure and Function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 20807-20810

L.B. Clerch, P. Whitney, M. Hass, K. Brew, T. Miller, et al. (1988) Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry* 27: 692–699.

A. Danguy, I. Camby, R. Kiss (2002) Galectins and cancer. *Biochim et Biophys Acta* 1572: 285–293.

R.P.M. Dings, D.W.J. van der Schaft, B. Hargittai, J. Haesman, A.W. Griffioen, K.H. Mayo (2003) Anti-tumor activity of the novel angiogenesis inhibitor anginex. *Cancer Letters* 194: 55-66

D. Hanahan, R.A. Weinberg (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.

Hirabayashi J, Kasai K, The family of metazoan metalindependent beta-galactoside-binding lectins: Structure, function and molecular evolution, *Glycobiology* 3, 297–304 (1993)

R.C. Hughes (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473: 172–185.

K Ito , SA Scott , S Cutler, LF Dong, J Neuzil, H Blanchard , SJ Ralph. (2011) Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. 14:293-307.

Kovács-Sólyom F, Blaskó A, Fajka-Boja R., Katona R.L., Végh L., et al. (2009) Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunology Letters*. 2009 IF(2009):2.906

K.H. Mayo, D.W.J. van der Schaft, A.W. Griffioen (2001) Designed B-sheet peptides that inhibit proliferation and induce apoptosis in endothelial cells. *Angiogenesis* 4: 45-51

V ,Mathieu, M Le Mercier, N De Neve,S Sauvage, T Gras, I Roland, F Lefranc, R Kiss. (2007) Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model. *J Invest Dermatol.* 127:2399-410.

N.L. Perillo, M.E. Marcus, L.G. Baum (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* 76: 402–412.

K. Pietras, A. Ostman (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316: 1324–1331.

G.A. Rabinovich (2005) Galectin-1 as a potential cancer target. *British Journal of Cancer* 92: 1188-1192

N. Rubinstein, M. Alvarez, N.W. Zwirner, M.A. Toscano, J.M. Ilarregui, et al (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5:241-251

D.W.J. van der Schaft, R. P. M. Dings, Q. G. de Lussanet, L. I. van Eijik, A. W. Nap et al. (2002) The designer antiangiogenic peptide anginex targets tumor endothelial cells and inhibits tumor growth in animal models. *The FASEB Journal*

K.A. Stannard, P.M. Collins, K. Ito, E.M. Sullivan, S.A. Scott, et al. (2010) Galectin inhibitory disaccharides promote tumour immunity in a breast cancer model. *Cancer Lett* 299: 95–110.

G.J. Szebeni, É. Kriston-Pál, P. Blazsó, R.L. Katona, J. Novák, et al. (2011) Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mesenchymal stem cell-mediated tumor promotion. *PLoS ONE* 7: 1-13

V.L.J.L. Thijssen, R. Postel, R. J.M.G.E. Brandwijk, R. P.M. Dings, I. Nesmelova, et al. (2006) Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15975–15980.

V. L.J.L. Thijssen, F. Poirier, L. G. Baum, A.W. Griffioen (2007) Galectins in tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *BLOOD* 110: 2819-2825

V.L. Thijssen, B. Barkan, H. Shoji, I.M. Aries, V. Mathieu, et al. (2010) Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Research* 70:6216-6224

## **VII. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm Dr. Monostori Évának a gondos témavezetését, és az útmutatásait, valamint, hogy lehetővé tette, hogy a csoport tagjává válhassak; Kriston-Pál Évának a kísérletek megtervezéséhez és végrehajtásához nyújtott segítségét; a csoport többi tagjának: Dr. Fajka-Boja Robertának, Dr. Czibula Ágnesnek, Szabó Enikőnek, Novák Juliannának, Gercsó Andrásnének hogy kérdéseimmel bátran fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom Dr. Martinek Tamásnak és Hegedűs Zsófiának (SZTE Gyógyszerkémiai Intézet) a kísérletekhez felhasznált anginex analógok és az anginex foldamer szintéziséért, valamint a dolgozatban felhasznált ábrákért.