

## **OTKA jelentés**

### **A májfibrózis és májrák A miofibroblasztok szerepe**

Az OTKA pályázat 4 éves kutatási periódusában vizsgálatainkat azok a korábbi években elért eredményeink és a nemzetközi adatok motiválták, melyek nyilvánvalóvá tették, hogy a daganatos stróma, melyet a tumorsejtek környezetében található nem parenchymalis sejtek ( fibroblasztok, miofibroblasztok, endotél, gyulladássos sejtek), valamint az extracelluláris mátrix alkotnak meghatározó szerepet játszanak a tumorok biológiai viselkedésében.

A beszámoló főszereplői a miofibroblasztok, ezt azt aktivált srómális sejt fenotípust azonban számos sejt öltheti magára. Így a beszámolóban az olvasó nem mindig talál egységes nevezéket, a máj és pancreas csillag sejtjei aktivációjukat követően morfológiailag nem különíthetők el az egyéb eredetű, pl a portalis területről származó, miofibroblasztoktól, de a máhnyakrák aktivált fibroblasztjai is miofibroblaszt külsővel rendelkeznek. Mivel az aktivált fibroblasztok egyik fő funkciója az extracelluláris mátrix fehérjék termelése a vizsgálatokból nem maradhattak ki olyan mátrix fehérjék, melyekről az utóbbi években nyilvánvalóvá vált, hogy fontos szerepük van a ráksejtek működésének szabályozásában. Számunkra ezek közül kitüntetett figyelmet érdemeltek a proteoglikánok, melyek 20 év óta kutatásaink központjában állnak. Emellett nem hagyhattuk figyelmen kívül néhány molekulát, melyekre a kutatásaink eredménye hívta fel a figyelmet, ilyen volt a TFPI2 proteáz inhibitor, vagy a matrilin 2.

Vizsgálataink két modellrendszeren zajlottak, részben párhuzamosan és nagymértékben támaszkodtak a megelőző 67925 számú pályázat eredményeire, bizonyos, nem teljesen lezárt kutatások tehát az új OTKA támogatás igénybevételével fejeződtek be.

Ezeket az eredményeket az 1. pontban ismertetem.

#### **1.**

**Az ép és daganat-asszociált fibroblasztok eltérő módon befolyásolják a méhnyakrák sejtek biológiai viselkedését.**

#### **a.**

### *A TFPI2 tumorszuppresszor gén expressziójának változásai.*

A vizsgálat során méhnyakrák miatt műtétilag eltávolított uterusok tumormentes és daganatos területeiből primer szövettényezeteket indítva normál és tumor asszociált fibroblasztokat tenyésztettünk, majd mRNS mikroarray-n vizsgáltuk az eltérő expressziójú mRNS-eket.

Kiválasztotuk az 5 legmagasabban és legalacsonyabban kifejeződő mRNS-t az NF-hez képest a tumor asszociált fibroblaszt (TAF) mintákban és ezeket real-time PCR-el validáltuk. A legjelentősebb változást a tissue factor pathway inhibitor (TFPI2), ami egy serin proteáz inhibitor, esetében észleltük, melynek expressziója tizedére csökkent és fehérje sem termelődik a TAF-okban, míg a normál fibroblasztban (NF) igen. Humán méhnyak rákok esetén a fehérje mennyisége az invázió mélységével párhuzamosan csökken. További vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a méhnyakrák sejtekben a fehérje génje metilált, ugyanakkor sem az ép, sem a daganatos fibroblasztban nem igazolódott a gén promóter régiójának metilációja. Az epigenetikus szabályozás másik fontos szereplőit, a mikroRNS-eket vizsgálva a mir23a szerepe vetődött fel mint ami a TAF-ban gátolja a TFPI2-t az mRNS 3' átíratlan részéhez kötődve. A mir23a szerepének igazolására az ép fibroblasztot mir23-al, a TAF-ot anti mir23-al készülünk transzfektálni.

Az irodalom áttanulmányozása során kiderült, hogy a TFPI2 kulcsszerepet játszik a tumoros invázió gátlásában génje számos daganatban metilálódik, ezért a génjét a szuppresszor gének közé sorolják. Az, hogy a daganatsejt hatására a TAF-okban is lecsökken az expressziója teljesen új megfigyelés.

A TFPI2 expressziójának vizsgálatát megkezdtük a hepatoma sejtvonalakban és az Ito (LX2) sejtekben is. Meglepő módon a differenciált HLE hepatoma termeli, míg a differenciáltabb HuH7 nem, a proteáz inhibitort. Nem tudtuk kimutatni a fehérjét az Ito sejtben sem. További 4 hepatoma vonal TFPI2 expresszióját tervezzük vizsgálni, kölcsönhatásban az LX2 Ito sejtekkel.

A méhnyakrákos modell eredményeit a mir és antimir 23-al történő transzfekciós vizsgálatokat követően kívánjuk közölni, a hepatomákon további vizsgálatokat tervezünk.

Mivel tumorokban a TFPI2 metilált DNS-e a keringésben kimutatható, terveink között szerepel az eljárás bevezetése.

**b.**

*Az ép és tumor asszociált fibroblasztok hatása a méhnyakrák sejtek biológiai viselkedésére.*

Vizsgálatainkban a daganatsejteket direkt és indirekt kokultúrákban tenyésztettük az NF és TAF sejtekkel.

A tumorsejtek és a fibroblasztok kölcsönhatásának eredménye eltérő volt a két fajta fibroblaszt esetén. Már méhnyakrák és ép portio minták immunhisztokémiai vizsgálata feltárta, hogy a normál portio fibrilláris, I és III típusú kollagénben gazdag ECM-jét abortív, lamininben gazdag ECM váltja fel a rákos szövetben. Az in vitro vizsgálatok pedig igazolták, hogy a méhnyak ráksejtek jelentős mértékben expresszálnak laminin receptorokat, elsősorban  $\alpha 6\beta 4$ -et és migrációs aktivitásuk szignifikánsan magasabb laminin matrix alkalmazása esetén. Az NF sejtek nagy mennyiségben termelnek TGFB1-et, mely a tumorsejtek lokális szaporodását segítik elő, míg a TAF-ok a tumorsejtek migrációját támogatják.

**BMC Cancer. 2015 Apr 11;15:256. doi: 10.1186/s12885-, 2015**

Ezek a vizsgálatok számos olyan eredményt szolgáltatottak, melyek iniciálták a máj modellben tervezett vizsgálatainkat.

**2.**

### **A strómális komponensek szerepe a mácirrhosis és májrák kialakulásában**

**a.**

*A különböző eredetű miofibroblasztok szerepe a máj fibrogenézis során.*

Patkánymáj modellen vizsgáltuk a perisinusoidális csillag (Ito) sejtek és a portális régió miofibroblasztjainak TGFB1-re adott válaszreakcióját. A sejteket patkány májából izoláltuk, majd TGFB1-e kezeltük és mRNS valamint fehérje szinten tanulmányoztuk az I, III és IV típusú kollagének termelését és azokat a jelátviteli utakat, melyek szerepet játszanak a fenti fehérjék szintézisének szabályozásában. Eredményeink arra utalnak, hogy bár a májban többféle sejt alakulhat át aktivált miofibroblaszttá, válaszreakciójuk különböző stimulusra eltérő lehet. Rendszerünkben a periszinusoidális csillagsejtek TGFB1 hatására az I és III típusú kollagén termelését fokozták, míg a portális fibroblaszt eredetű sejtek a IV-es típusú

kollagén fokozott termelésével válaszoltak a TGFB1 kezelésre. Vizsgálataink sejt szinten alátámasztották, hogy a Decorin, egy kis leucin gazdag CS,DS proteoglikán gátolni képes a TGFB1 hatását, vagyis gátolja a máj fibrogenezist. A jelenség azért figyelemre méltó, mivel a decorint, hasonlóan a kollagénekhez, az a kivált miofibroblasztok termelik és a molekulának fontos szerepe van a kollagénrostok méretének és integritásának szabályozásában is.

[Pathology Oncology Research 2016 DOI: 10.1007/s12253-016-0095-0](https://doi.org/10.1007/s12253-016-0095-0)

**b.**

*A Decorin máj fibrogenezist gátló hatásának bizonyítása állatmodellben.*

A decorin fibrogenezisben játszott szerepének bizonyításához Filadelfiából, Dr Renato Iozzo laboratóriumából decorin-/- egereket szereztünk be és ezeknél valamint vad típusú állatoknál thioacetamiddal májcirrhosist idéztünk elő. A cirrhosis foka lényegesen súlyosabb volt a decorin defficiens egereknél.

A miofibroblasztok szerepét bizonyítandó immortalizált Ito sejtekből (Dr Scott Freadman New York) ajándéka) decorin shRNS segítségével inaktíváltuk a decorin mRNS-t majd TGFB1 kezelést követően meghatároztuk a simaizom aktin fehérje mennyiségét, mely az Ito sejtek aktivációjának fokmérője. A vizsgálatok bizonyították, hogy a decorin kiütése esetén a miofibroblasztok aktiválódása fokozódik ami fokozott kötőszövet termeléssel jár együtt.

A jelenség hátterében két mechanizmus igazolódott: 1. A decorin köti és inaktíválja a TGFB1-et, 2. A decorin az EGFR receptorhoz kötődve akadályozza az EGF indukált jelátvitelt.

Ezek az események a HSC aktivitásának csökkenését eredményezik.

[J Histochem Cytochem. 2012 Apr;60\(4\):262-8](https://doi.org/10.1007/s12253-012-262-8)

**c.**

*A decorin szerepe a hepatocarcinogenesisben*

A decorin -/- egerekben a hepatokarcinogének hatása fokozódik. Két hepatokarcinogén a TAA és a DEN vizsgálata egyértelműen bebizonyította, hogy a KO egerekben több és nagyobb májtumorok jönnek létre, mint a kontrol egerek májában. A vad típusú állatok kezelése során a májokban a decorin tartalom nő, ami védekező reakcióként értékelhető. Decorin hiányában fokozódik az Akt aktivációja, mely a GSK3 alfa inaktívációján keresztül fokozott  $\beta$  catenin aktivációt idéz elő. Utóbbi a cmyc fokozott átírásához vezet, melyet a csökkent GSK3a nem tud foszforilációval inaktíválni. A cmyc serkenti az AP4 faktor szintézisét, mely a p21 cdk4 inhibitor gátlásához és a retinoblasztoma foszforilációjához vezet.

A tirozinkináz receptorok aktiválódását vizsgálva a hepatocarcinogenesis modellekben a decorin -/- tumorokban fokozott aktiváció volt megfigyelhető a PDGFR, EGFR, MSPR és IGF1R receptorok esetén.

**Matrix Biology 2014. Apr 35:194-205.**

A decorin humán májrákokban játszott szerepére vonatkozó vizsgálataink szintén a proteoglikán jelentőségére utalnak. A májrákokban a decorin mennyisége kifejezetten csökken, és a SMA pozitív miofibroblasztok decorin negatívvá válnak.

**d.**

*A matrilin 2 szerepe a hepatocarcinogenesisben.*

A miofibroblasztok egyéb mátrix fehérjék mellett matrilin2-t is termelnek. Egy 2014-ben megjelent közlemény szerint a fokozott mátrilin 2 termelésnek azonban nincs szerepe a máj fibrogenézis eseményeiben ( Liver International [Volume 35, Issue 4](#), pages 1265–1273, April 2015) Saját kutatásaink azt vizsgálták hogyan alakul a hepatocarcinogenesis matrilin2 hiányos egerekben.

Szemben a decorin -/- egérmodellel, ahol karcinogén vegyület adása nélkül nem figyeltünk meg eltérést az egerek májában, a mátrilin2 -/- egerek mája spontán létrejött neoplasztikus fókuszokat tartalmazott, a p21/CIP expressziója csökkent és fokozott retinoblasztoma foszforiláció igazolódott.

A jelenség hátterében az EGFR receptor és az ERK2,1 fokozott aktivációját és a pc-myc jelentős csökkenését észleltük. Az immunhisztokémiai vizsgálatok a  $\beta$  catenin fokozott expresszióját és a GSK $\beta$  csökkenését igazolták a kezeletlen matn-/- májakban. A DEN karcinogenezist követően a matn-/- egerekben szignifikánsan több és nagyobb májrák alakult ki.

Ez a vizsgálat arra utal, hogy a miofibroblasztok számos olyan mátrixfehérjét szintetizálnak, melyek szerepet játszanak a spontán és az indukált hepatokarcinogenesisben. A matrilin2 esetében felvetődik a fehérje tumor szuppresszor szerepe.

**Plos One 2014 Apr 1;9(4):e93469. doi10.1371/journal.pone.0093469, 2014**

**e.**

Mind a máj, mind a hasnyálmirigy esetében egyre több adat lát napvilágot, hogy a diabetes és egyik fő jelensége a hyperglycaemia szoros összefüggést mutat a fibrózis és a daganat kialakulásával mindkét szervben. Ezért in vitro kísérleteket végeztünk annak eldöntésére milyen hatással van a hyperglycaemia önmagában vagy TGFB1 adásával kombinálva a csillagsejtekre.

*A krónikus hyperglycaemia a pancreas csillagsejtek aktivációját idézi elő ezáltal fokozódik a malignitáshoz köthető kommunikáció a csillagsejtek és a pancreas ráksejtek között.*

A magas (15mM) glukóz koncentrációjú tenyésztő folyadékban növesztett csillagsejtek fokozottan termelik a CXCL12 cytokint. Ennek hátterében a p38 és az ERK 2,1 fokozott foszforilációja áll, mely a CDC25, SP1, cFOS és p21 fehérjék fokozott termeléséhez vezet. Az SP1 a CXCL12 ismert transzkripció faktor, feltehetően ez fokozza a cytokin mRNS-ének közvetlen átírását. A csillagsejtek felszínén nincs CXCR4 ami a CXCL12 receptora. Ugyanakkor a hasnyálmirigy rák sejtjeinek felszínén a receptor kimutatható. Ennek megfelelően a csillagsejtek által termelt, CXCL12-t tartalmazó kondicionált médiumban növesztve a pancreas rák sejtjeiben a MAPK jelátviteli útvonal aktiválódását figyeltük meg.

Eredményeink bizonyítják, hogy csillagsejtek és ráksejtek kölcsönhatása fokozza a ráksejtek proliferációját és migrációját, tehát az adatok humán vonatkozásban értékelve megerősítik azt a feltevést, hogy a pancreas csillag (Ito) sejtek hyperglycaemiás környezetben elősegítik a daganatos folyamat kialakulását a pancreasban.

[PLoS One. 2015 May 26;10\(5\):e0128059. doi: 10.1371](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128059)

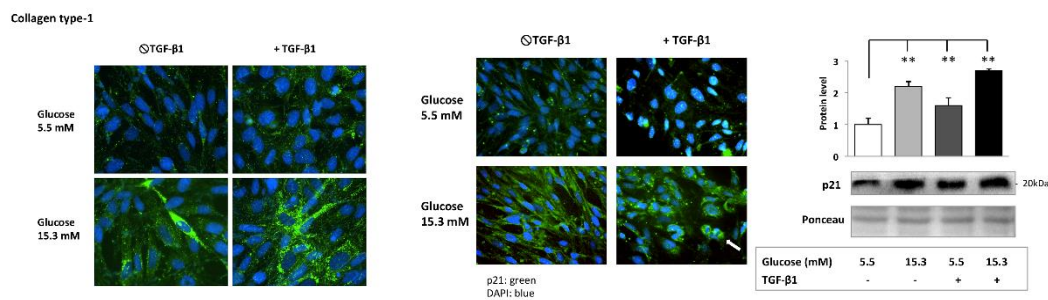
f.

*Krónikus hyperglycaemia hatása a máj csillag (Ito) sejtjeire.*

Mivel a humán diabetes nagy kockázatot jelent zsírmáj, fibrózis, majd májcirrhosis végül májrák kialakulására továbbiakban arra számítottunk, hogy a pancreas esetén megfigyelthez hasonló eseményeket észlelünk máj modellünkben is.

A vizsgálatok elsősorban a magas cukorkoncentráció fibrogenézisben betöltött szerepét kívánták értelmezni, LX2 immortalizált csillagsejteken a hyperglycaemia hatását a TGFB1-el vetettük össze.

Meglepetésünkre a vizsgált modellben a TGFB1 minden hatását sikerült regisztrálnunk, (SMAD jelátvitel, kollagén szintézis fokozódása, Akt aktiváció, GSK3a foszforiláció) míg a magas cukor hatására a fibrogenézis nem aktiválódott érdemben. A csillagsejtek nem termeltek CXCL12-t sem. Ami viszont feltűnő volt, hogy a magas cukor koncentráció esetén a kollagén I szekréciója a csillag sejtekből zavart szenvedett. A magas cukor koncentráció és a TGFB1 egyaránt fokozta a p21/Cip fehérje mennyiségét a Western blot szerint. Ismerve a p21 proliferáció gátló hatását, az eredmény nehezen volt értelmezhető. A p21 immuncitokémia azonban rámutatott, hogy míg a kontrol és TGFB1-el kezelt normoglikémiás sejtjeiben a p21 valóban a sejtmagban van, magas cukor koncentráció esetén a fehérje a citoplazmába lokalizálódik. Ez a szituáció viszont gátolja az apoptosist és sejtjei felszaporodását idézi elő.



1. ábra Az I típusú kollagén transzportjának zavara és a p21/Cip fehérje citoplazmatikus lokalizációja magas cukorkoncentráció következtében.

A munkából a kéziratot jelenleg készül.

## g

In vitro modellek a máj aktivált csillag (Ito) sejtjeinek és a hepatoma sejteknek az interakciójára.

*A csillagsejtek hepatoma sejtekre adott válaszreakcióját meghatározza a hepatoma fenotípusa.*

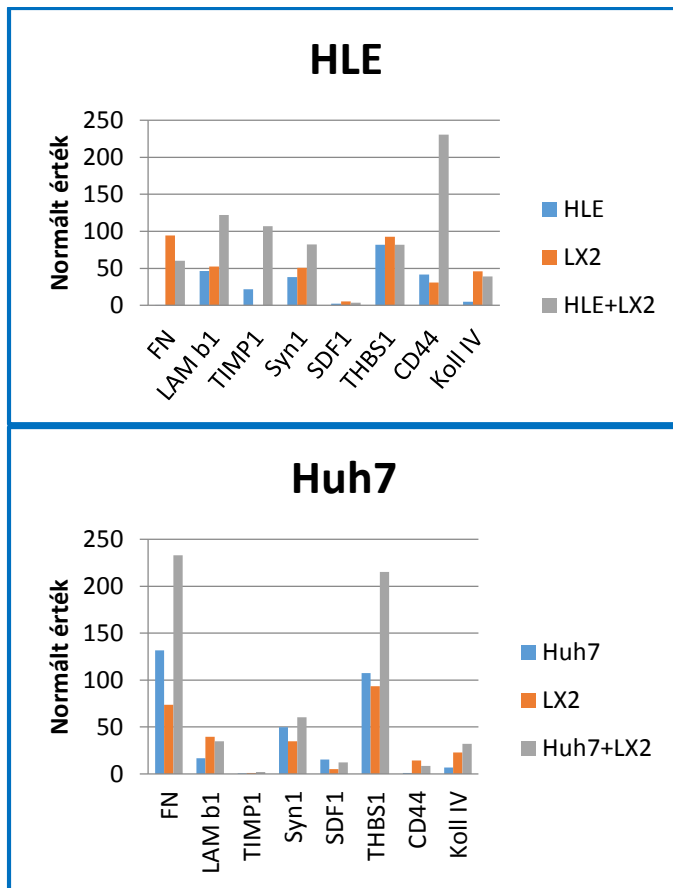
Egy gyorsan proliferáló (HLE) és egy differenciáltabb, lassabban proliferáló (HuH7) hepatoma sejtvonalat LX2 immortalizált Ito sejtvonal kondicionált médiumával kezeltünk.

A kezelés hatására a HLE sejtvonalban a MAPK és a WNT jelátviteli út egyaránt aktiválódott, a p21/Cip fehérje mennyisége csökkent. A HuH7 sejtvonalban csak a WNT jelátvitel aktiválódott, de a p21 expresszió itt is csökkent. A LX2 kondicionált médium az eredetileg lassan növekvő HuH7 sejtvonal proliferációs aktivitását fokozta. Mindkét tumor sejtvonalban fokozódott az autofágiában szerepet játszó LC3 fehérje mennyisége, míg a becliné csökkent. A mitokondriumok külső membránjában található TOMM 20 fehérje termelése szintén fokozódott, ami arra utal, hogy az LX2 kondicionált médiuma aktiválja a tumorsejtek metabolizmusát. A sejtek direkt kokultúrában történő növesztése reámutatott, hogy más mátrixfehérjéket termel az LX2 sejt ha a differenciálatlan HLA vagy a differenciált HuH7 hepatomával tenyésztjük együtt. Az előbbi esetén fokozottan termelődő matrix fehérjék

a migráció és invázió elősegítésében érintettek ( laminin, CD44, MMP2 és MMP9, syndecan1 shedding), míg az utóbbi esetében inkább a lokális növekedés esetén jelenlévők (MMP1, fibronectin, thrombospondin, TFPI2) voltak megfigyelhetők.

Ezek a vizsgálataink arra utalnak, hogy a májrák biológiai viselkedését nagymértékben meghatározza a daganat tumorsejtjeinek és a miofibroblasztjainak interakciója, tehát nem beszélhetünk egy általános májrák fenotípusról.

Jelenleg a vizsgálati eredmények validálása történik.



2.ábra. Az LX2 sejtek mátrixtermelése differencialtalan (HLE) és differenciált (HUH7) hepatómával növesztve kokultúrában.

## h

Heparánszulfát és heparánszulfát proteoglikánok szerepe a májrákok biológiai viselkedésében.

Ahogy a fent bemutatott kísérletsorozatban is látható a sejtfelszíni HSPG a syndecan-1 eltérően viselkedik a különböző hepatómák esetén. A molekula cukorlánc a heparánszulfát részben negatív töltésének, részben speciális struktúrájának köszönhetően számos növekedési faktorról, citokinnel és azok receptoraival képes kölcsönhatásba kerülni, ezáltal sejtfelszíni co-receptorként működik. Extracelluláris doménjének lehasadása által szignál molekulákat képes eltávolítani a sejtfelszínről, nagymértékben befolyásolva adott sejtek működését. A keringésben felszaporodó syndecan-1 számos tumor esetén a rossz prognózis biomarkere. Ezen, már korábban ismert, funkciók mellett a 2000-es évek elején saját és 2 másik munkacsoport beszámolt arról, hogy a syndecan-1 és a heparánszulfát a sejtmagban is megtalálható.

2014-ben megjelent, közleményünk a heparánszulfát egyik sejtmagi funkcióját bizonyítja, aminek alapja az, hogy a heparánszulfát és a heparin gátolja a topoizomeráz enzim aktivitását.



*Heparin és a májból izolált heparánszulfát megmenti a hepatoma sejteket a Topotecan citosztatikus hatásától.*

Vizsgálatainkhoz ép májból, májrákból és hepatoma sejtvonalakból sejtmagot izoláltunk melyeknek 0.35 M NaCl-el extrahált frakciója tartalmazta a topoizomerázt. A heparán szulfátot is májmintákból nyertük. Megállapítottuk ,hogy heparin és heparánszulfát jelenlétében a topoizomeráz enzim nem képes a DNS-hez kötődni és hasítani azt. Mivel a topoizomeráz gátló Topotecan hatásához szükséges a topoizomeráz-DNS interakció, ennek hiányában a szer hatástalanná válik.

Ez az eredmény gyakorlati jelentőséggel bír,mivel topoizomeráz gátló szerrel számos beteget kezelnek. Ezenél a betegeknél heparin kezelés a gyógyszer hatékonyságát megváltoztatja.

[Biomed Res. Int. 2014:765794. doi 10.1155/2014](#)

[Biochim.Biopys.Acta 2014, 1840: 2491-7., 2014](#)

Az OTKA projekt támogatásával felkérésre született meg review közleményünk a máj proteoglikánjairól

[World J Gastroenterol. Jan 7, 2016; 22\(1\): 379-393 doi: 10.3748/wjg.v22.i1.379, 2016](#)