

**AZ OTKA ÁLTAL TÁMOGATOTT 81847 AZONOSÍTÓ SZÁMÚ
„A XIII-AS FAKTOR A ALEGYSÉGE IMMUNHISZTOKÉMIAI
KIMUTATÁSÁNAK DERMATOPATOLÓGIAI HASZNOSÍTÁSA ÉS
ÉRTÉKELÉSE” CÍMŰ PÁLYÁZAT SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉSE**

1. Az intracelluláris FXIII-A szerepe a makrofágok génexpressziójában

Korábbi kutatásaink során a szakirodalomban elsőként igazoltuk, hogy a véralvadás XIII-as faktorának a alegysége (FXIII-A) az alternatívan aktivált makrofágok markerének tekinthető, azaz olyan makrofágokban fejeződik csak ki, melyek nem a klasszikus értelemben vett, kórokozók (mint pl. a *Mycobacterium tuberculosis*) szembeni védekezésre aktiválódnak, hanem a szöveti környezet átrendeződésének (mely jellemző a sebgyógyulásra, számos nem infektív eredetű reaktív bőrgyógyászati kórképre vagy a tumorszövet átépülésére) hatására (Töröcsik D, Bárdos H, Nagy L, Ádány R.: Cell Mol Life Sci., 62:2132-2139, 2005). Míg a klasszikus aktiváció indukálásában az interferon gamma, addig az alternatív aktivációban az interleukin 4 (IL4) citokin tölt be kulcsszerepet.

A kutatási terv megvalósításának első lépéseként arra kerestük a választ, hogy a FXIII-A, melyről korábban azt is kimutattuk, hogy jellegzetes mintázattal képes akumulálódni a sejtmagban is (Ádány R, Bárdos H, Antal M, Módis L, Sárváry A, Szücs S, Balogh I.: Thromb Haemost., 85:845-851, 2001) milyen szerepet tölt be a makrofágok alternatív aktivációjában. Feltételezve, hogy a FXIII-A sejtmagon belüli megjelenése összefüggésben lehet a makrofágok gén expressziójának szabályozásával, kísérleti rendszerünkben összehasonlítottuk az IL4 jelenlétében differenciáltatott normál és FXIII-A deficiens humán monociták/makrofágok gén expressziós profilját. Az IL4 jelenlétében 48 órán át tenyésztett normál és FXIII-A deficiens sejtek gén expressziós profiljának microarray összehasonlító analízise során a vizsgált 24.398 gén-szekvencia közül a deficiens sejtek esetében 1.017, míg a normál sejtek esetében 596 szekvencia expressziója volt IL4-szenzitív, melyek közül 307 a normál és a deficiens sejtekben azonosnak bizonyult. A Cytoscape/BiNGO és Ingenuity Pathways Analysis programokkal elvégzett

"functional clustering" analízis szerint a domináns génexpressziós eltérések az immunregulációban és a sebgyógyulásban involvált géncsoportokban voltak észlelhetők (1). Az eredmények jó összhangban vannak a FXIII-A deficiens betegek esetében észlelt klinikai eltérésekkel, s alapul szolgálnak a FXIII-A intracelluláris szerepének értelmezéséhez is.

2.. A FXIII-A immunhisztokémiai detektálásának diagnosztikai alkalmazása a makrofágok és dendritikus sejtek elkülönítéséhez

A daganatos szöveti környezetben jelenlevő immunsejtek karakterizálása során és a gyulladásos bőrgyógyászati betegségek szövettani diagnosztikájában komoly nehézséget jelent a makrofágok és a dendritikus sejtek elkülönítése, melynek esetenként igen jelentős diagnosztikai és terápiás konzekvenciája van. További munkánk során arra kerestük a választ, hogy a FXIII-A immunhisztokémiai detektálása segíthet-e ezen morfológiailag hasonló, azonban funkciójukban jelentősen eltérő sejtek megkülönböztetésében. Vizsgálatainkat ennek megfelelően kiterjesztettük egyrészt különböző bőrbetegségek makrofág populációinak karakterizálására, valamint japán kollaborációs partnereinkkel együttműködésben a tumor asszociált makrofágok (TAM) dendritikus sejt irányba való differenciálódása során bekövetkező markersajátságainak elemzésére (2).

Eredmények egyrészt arra utalnak, hogy a FXIII-A kimutatása a bőrgyógyászati diagnosztikában és a TAM karakterizálás, ill. a tumor progresszió jellemzése szempontjából is értékesíthető marker-reakció lehet.

A bőrgyógyászati diagnosztikai hasznosítás jellemzéséhez olyan kórképeket választottunk melyek közös jellemzője, hogy jelentős számú makrofág és dendritikus sejt akkumulációval járó gyulladásos bőrgyógyászati megbetegedések, melyek semmiféle infekcióval vagy malignitással nem hozhatóak összefüggésbe; ezek a granuloma annulare (GA), a necrobiosis lipoidica (NL) valamint a jelentős zsírfelhalmozódást mutató szemhéji xanthelasma. Ezen betegségek szövettani mintáiban kettős jelzésű immunhisztokémiai rendszerekben vizsgáltuk a Langrehans sejt specifikus CD1a, a dendritikus sejtekre jellemző CD11c, a monocita/makrofág sejtvonalra jellemző CD14, a

döntően makrofágokra specifikus CD68, a jelenleg legelfogadottabb makrofág marker CD163, valamint a makrofágok egy csoportján és a dendritikus sejteken egyaránt megjelenő mannose receptor (CD206) és DC-SIGN (CD209) fehérjék kifejeződését a FXIII-A expresszióval összefüggésben. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a GA és NL betegségekben a CD163+ makrofágokat FXIII-A pozitivitás jellemzi (CD163+/FXIII-A+) szemben a xanthelasma FXIII-A negatív (CD163+/FXIII-A-) makrofágjaival, utalva arra, hogy ezen utóbbi fenotípus a fokozott zsírnycserével hozható összefüggésbe. További jelentős különbség, hogy GA és NL esetében a CD163+ és CD11c+ sejtek teljesen elkülönülő populációkat alkottak: míg a szövet nekrotikus részeiben kizárólagosan a CD11c+ sejtek halmozódnak fel, addig a CD163+ sejtek körük csoportosulva és a szövet egyéb struktúráit infiltrálva figyelhetőek meg (3, 4). CD11c és a FXIII-A celluláris ko-lokalizációja a GA és NL mintákban kizárólag a (különböző nagyságrendű erek környezetében) perivaszkuláris lokalizációjú makrofágok esetében volt megfigyelhető. E sajátos marker-mintázattal jellemezhető sejtpopuláció karakterizálása során technikai-metodikai nehézségekkel szembesültünk, melyek megoldására csak a közelmúltban nyílt lehetőség – a karakterizálás rövid időn belül befejeződik. A FXIII-A és az alternatív makrofág aktivációt jelző egyéb markerfehérjék, mint a CD206 és CD209 szimultán expressziója a döntően szöveti átépüléssel járó granulomatózus bőrbetegségek CD163+ sejteiben további bizonyíték arra, hogy az ezen kórképekben felhalmozódó makrofágok alternatív aktivált állapotban vannak. A publikáció a dermatohisztopatológia területén hiánypótlónak tekinthető, hiszen a FXIII-A-t számos bőrbetegség diagnosztikájában és használják makrofágok - és számos esetben helytelenül, amire a közleményünkben is felhívtuk a figyelmet, a dendritikus sejtek - diagnosztikai markereként, anélkül, hogy kifejeződésének okát, illetve annak funkcionális jelentőségét ismernék. Eddigi munkánk alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a FXIII-A expressziója nem betegség-specifikus, hanem az alternatíván aktiválódott makrofágok markere, melynek koexpressziója egyéb makrofág markerekkel a szöveti környezet sajátosságaival mutat összefüggést. A közlemény anyaga ugyanakkor nem csak a makrofágok és dendritikus sejtek immunhisztomémiai elkülönítéséhez ad biztos iránymutatást, hanem a vizsgált betegségek patogenezisére vonatkozóan is jelentős, új információkat szolgáltat. Ezen közlemény alapján felvetődik továbbá annak

szükségessége is, hogy a GA és NL-t, mint a „tankönyvi” példáit a makrofág-akkumulációval járó bőrbetegségeknek, a dendritikus sejtek irányából is megközelítsük, új patológiai és esetleges terápiás célpontokat keresve. A közlemény elismerő nemzetközi fogadtatását jelzi hogy számos felkérést kaptunk előadás tartására, mint a Keystone symposia keretei között megrendezésre kerülő „Granulomas in Infectious and Non-Infectious Diseases” (<http://www.keystonesymposia.org/15J4>) vagy a négyévente megrendezésre kerülő „23rd World Congress of Dermatology” (2015 június 8-13, Vancouver, Canada) – „Granulomatous Disorders (non-infectious) – from Sarcoidosis to IGD” szekciójába (a program még nem elérhető).

3. A zsíryanycsere és a FXIII-A expressziója közötti kapcsolat vizsgálata

A FXIII-A immunhisztokémiai kimutatására épülő szövettani elemzéseinket kiterjesztettük aknés minták immunhisztokémiai vizsgálatára, s kimutattuk, hogy míg a faggyúmirigyek környezetében elhelyezkedő makrofágok az alternatív aktiváció markereivel (CD163+/CD206+/CD209+/FXIII-A+) jellemezhetők, addig a folliculus gyulladt struktúráját infiltráló makrofágok a klasszikus aktivációra jeleit (CD163+/FXIII-A-) mutatják. A faggyúsejtek körüli makrofág akkumuláció értelmezéséhez *in vitro* kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az aktivációs stimulus generálásában maguk a faggyúsejtek is szereppel bírhatnak, és képesek az exogen aktivációs stimulusok hatását is befolyásolni. Közlésre előkészített tanulmányban bemutatjuk, hogy míg a faggyúsejtek által termelt fehérjék, mint az CXCL-8 és IL-6, elsősorban a makrofágok „vonzásában” és aktiválásában játszhatnak szerepet, addig a zsírok a makrofágok alternatív polarizációjához vezethetnek. A faggyúsejtek által termelt citokinek profiljának meghatározásán kívül az alternatív polarizáció további bizonyítéka, a már korábban bemutatott CD206 és CD209, valamint a FXIII-A expressziójának a növekedése volt (5). A vizsgálatok koncepcionális jelentőséggel bíró eredménye, hogy a FXIII-A emelkedésében a faggyúsejtek által termelt zsírok és nem az IL-4 szerepe feltételezhető (fehérjeszintű méréseink alapján a faggyúsejtek nem termeltek IL4-et, továbbá a zsírok szelektív depletálásával az alteratív aktiváció befolyásolható volt). E ténynek komoly terápiás vonzata lehet, hisz számos gyulladáscsökkentő zsírtermészetű topikális kezelés

ismert a bőrgyógyászatban, amelyeknek a makrofágokra gyakorolt hatása ezidáig nem került vizsgálatra).

4. A melanoma tumor asszociált makrofágjainak FXIII-A expressziója

Normál bőrből, naevusokból és melanoma mintákból (6 normál bőr, 6 naevus, 23 nem metasztatizáló és 23 metasztázist adó primer melanoma) készült szöveti array-ken a FXIII-A+ makrofágok denzitásának és a malignitás mértékének összevetésével megállapítottuk, hogy a jóindulatú festékes anyajegyek környezetében a normál bőrre jellemzőhöz képest a FXIII-A+/CD163+ makrofágok kismértékű, míg a metasztázist nem adó, többnyire vékony melanomák (Breslow vastagság < 1,5 mm) körül a peritumorális strómában a makrofágok és dendritikus sejtek erőteljes akkumulációja tapasztalható. A tumor vastagság és a metasztázis képzés gyakoriságának növekedésével együtt járó angiogenezis következtében a melanomába benövő érhálózatokkal összefüggésben elsősorban FXIII-A+/CD163+ pozitív makrofágok jelenléte észlelhető, de CD11c+ (azaz dendritikus) sejtek is kimutathatók. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a FXIII-A+/CD163+ makrofágok a tumor angiogenesisben, s így a tumor progresszióban és metasztázis képzésben valószínűleg fontos szerepet játszanak. Ezen vizsgálatok jól egészítik ki a közelmúltban komplettált, a melanoma progresszió genetikai hátterének tisztázását célzó részben a projekt keretében (6) megvalósult vizsgálatokat (7-13).

Hivatkozott, az OTKA beszámolóhoz kapcsolódó közlemények/kéziratok:

1. Törőcsik D, Szeles L, Paragh G Jr, Rakosy Z, Bardos H, Nagy L, Balazs M, Inbal A, Adány R.: Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thromb. Haemost.*, 104:709-17. 2010 IF: 4, 701
2. Kitoh Y, Saio M, Gotoh N, Umemura N, Nonaka K, Bai J, Vizkeleti L, Torocsik D, Balazs M, Adany R, Takami T.: Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic cell-like signaling in vitro. *Int. J. Oncol.*, 38:1409-19. 2011
3. Törőcsik, D., Bárdos, H., Hatalyák, Z., Dezső, B., Losonczy, G., Paragh, L., Péter, Z., Balázs, M., Remenyik, E., Adány, R.: Detection of factor XIII-A is a valuable tool for distinguishing dendritic cells and tissue macrophages in granuloma annulare and necrobiosis lipoidica. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28 (8), 1087-96, 2014 IF: 3,105

4. Paragh L, Fiatal S, Harangi M, Poliska S, Nagy P, Bardos H, Nagy GG, Losonczy G, Ádány R, Törőcsik D: Histological, genetic and clinical analysis of xanthelasma palpebrarum – közlésre előkészítve
5. Lovaszi M, Mattii M, Eyerich K, Kovacs D, Szegedi A, Kemeny L, Remenyik E, Zouboulis C, Adany R, Eyerch S, Törőcsik D: Sebocytes contribute to activation and differentiation of macrophages – közlésre előkészítve
6. Ecsedi, Sz., Hernandez-Vargas, H., Lima, S. C., Vizkeleti, L., Tóth, R., Lázár, V., Koroknai, V., Kiss, T., Emri, G., Herceg, Z., Ádány, R., Balázs, M.: DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour. PLoS One, 15, 9, 5, e96612, doi: 10.1371/journal.pone.0096612. eCollection (2014). 3,534
7. Vizkeleti L, Ecsedi S, Rákosy Z, Orosz A, Lázár V, Emri G, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M: The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. Tumour Biol., 33:2189-99. 2012
8. Lázár V, Ecsedi S, Vizkeleti L, Rákosy Z, Boross G, Szappanos B, Bégány Á, Emri G, Ádány R, Balázs M: Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization. Melanoma Res., 22:202-14. 2012
9. Vizkeleti L, Ecsedi S, Rákosy Z, Bégány Á, Emri G, Tóth R, Orosz A, Szöllősi AG, Méhes G, Ádány R, Balázs M: Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma. Front Biosci., 4: 1802-12. 2012
10. Rákosy Z, Ecsedi S, Tóth R, Vizkeleti L, Hernandez-Vargas H, Lázár V, Emri G, Szatmári I, Herceg Z, Ádány R, Balázs M: Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. PloS One, 8:e54958. 2013
11. Ecsedi SI, Hernandez-Vargas H, Lima SC, Herceg Z, Adany R, Balazs M.: Transposable hypomethylation is associated with metastatic capacity of primary melanomas. Int J Clin Exp Pathol., 6:2943-2948. 2013
12. Kiss I, Ecsedi Sz, Vizkeleti L, Koroknai V, Emri G, Kovács N, Adany R, Balazs M The role of osteopontin expression in melanoma progression : Tumor Biology (under revision)
13. Koroknai V, Ecsedi Sz, Vizkeleti L, Kiss T, Szász I, Lukács A, Papp O, Ádány R, Balázs M: Genomic profiling of invasive melanoma cell lines by arrayCGH Melanoma Research (submitted)

OTKA támogatással létrejött konferencia előadások (és absztraktok):

- **Annual International Factor XIII Symposium/Workshop at the 55th GTH, Wiesbaden, Németország** (2011. február)
 - FXIII expression in alternatively activated macrophages and the role of FXIII in gene expression alterations in connection with activation
- **World Congress of Dermatology konferencia, Szöul, Dél-Korea** (2011. május)
 - The Factor XIII-A positive macrophages accumulating in different skin lesions are alternatively activated

- **International Investigative Dermatology konferencia, Edinburgh, Skócia** (2013. május)
 - Detection of Factor XIII subunit A distinguishes dendritic cells and tissue macrophages in non-infectious granulomatous skin lesions
- **Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlése, Budapest** (2013. december)
 - A faggyúsejtek befolyásolják a makrofágok aktivációját
- **Society for Investigative Dermatology konferencia, Albuquerque, USA** (2014. május)
 - Histological analysis of acne samples reveals different macrophage populations within the pilosebaceous unit
- **Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlése, Budapest** (2014. november)
 - Granulomatous betegségek differenciáldiagnosztikája
 - A xanthelasma “biopsziája” 2014 módszereivel
- **Keystone Symposia, Santa Fe, USA** (2015. január)
 - Immunohistochemical characterization of FXIII-A+ cells in non-infectious granulomatous skin lesions
- **World Congress of Dermatology konferencia, Vancouver, Kanada** (2015. június)
 - Clinical, Histological and Genetic Dissection of Xanthelasma Palpebrarum
 - Granuloma annulare and necrobiosis lipoidica