

TGFb hatásmechanizmusai, TGFb rezisztencia háttere a daganat növekedésében és terápiás válaszában (Zárójelentés)

A transzformáló növekedési faktor béta (TGFb) növekedésgátló hatásának nagy figyelmet szentelnek a legkülönbözőbb vizsgálatokban, számos tanulmány igazolta a TGFb tumorszuppresszor funkcióit a daganatkezelésben. A legújabb eredmények, a TGFb jelátviteli hálózatának megismerése segíti a TGFb összetett szerepének megértését, és segíti a potenciális terápiás targetek kijelölését is. A TGFb hatásmechanizmusai, TGFb rezisztencia háttere a daganat növekedésében és terápiás válaszában pályázat által támogatott munkánkkal mi is hozzá tudunk járulni az elmúlt évek eredményeihez.

A daganatok kialakulása és növekedése során bekövetkező, a TGFb hatását érintő változások a következők lehetnek: (a) a tumor érzéketlenné válik a TGFb növekedést gátló hatásával szemben; (b) a tumorsejtek a szükséges exogén növekedési faktorok hiányában is proliferálnak; (c) a TGFb indukálta apoptózissal szemben rezisztencia alakul ki a tumorban; (d) a TGFb segíti az inváziót, a metasztázis képződést, az angiogenezist és immunszuppresszív hatását.

Sok betegség hátterében ismert a TGFb funkciójának kiesése, a TGFb patológiás szerepe; TGFb rezisztenciát figyeltek meg számos daganatsejt esetében. Ezekben az esetekben a kiinduló sejttípus növekedését a TGFb gátolja, de a daganatsejtekben számos, eddig már feltárt, de bizonyos daganatok esetében még tisztázatlan módon a sejtek elkerülik a TGFb negatív szabályozó hatásait. A TGFb célgének hibái mellett gyakran a receptorok, illetve a Smad proteinek kóros jelenlétét, hiányát, mennyiségi változásait lehet megtalálni a háttérben, mindezek mellett bizonyos, a túlélést biztosító mechanizmusok aktivitása is megjelenhet.

Különböző lymphomák esetében már korábban jól ismert volt a TGFb érzékenység elvesztése, de a jelenség pontos hátterét nem ismertük. Korábbi munkáinkban jellemeztük legkülönbözőbb lymphoma sejtvonalak TGFb érzékenységét és azt találtuk, hogy az érzékenység megváltozásának hátterében nem a jelátviteli elemek expressziójának hiánya, nem a TGFb Smad szignál működésének kiesése áll (G. Barna, A. Sebestyén, C.C. Chinopoulos, K. Nagy, R. Mihalik, S. Paku, L. Kopper: TGF beta 1 kills lymphoma cells using mitochondrial apoptotic pathway with the help of caspase-8. *Anticancer Res* 22(6C), 3867-3872, 2002, A. Sebestyén, G. Barna, K. Nagy, J. Jánosi, S. Paku, E. Kohut, L. Berczi, R. Mihalik, L. Kopper: Smad signal and TGFβ induced apoptosis in human lymphoma cells. *Cytokine* 30, 228-235, 2005).

A pályázat végrehajtása közben kapott új eredményeink

Smad4 független, PP2A függő TGFb indukált apoptotikus jelátviteli pálya lymphoma sejtekben

Az elmúlt években a lymphoma sejtekben megfigyelhető TGFb indukált expresszió változások és jelátviteli mechanizmusok vizsgálata közben jellemeztük a TGFb apoptotikus hatását, az indukált apoptózisban fontos jelátviteli útvonalakat. Domináns negatív Smad4 vektor és Smad4 siRNS tranziens transzfekciójával vizsgáltuk az elsődleges Smad4 függő jelátviteli út szerepét a lymphomasejtek TGFb indukált apoptózisában.

A TGFb indukált apoptotikus hatással szemben rezisztens lymphoma többségében ki tudtuk mutatni a TGFbR-ok aktiválódását, a TGFb korai vagy késői target génjeinek expresszió változásait, míg a TGFb indukált proliferációs és apoptotikus válaszok elmaradtak. Kimutattuk, hogy a Smad4 (elsődleges jelátviteli út központi eleme) molekula kiütése gátolta az elsődleges jelátviteli út target génjeinek expresszió változását, de a TGFb indukált apoptózis mértékét nem befolyásolta. A Folyamat során vizsgáltuk a MAPK-ok aktivitásának változását, azt tapasztaltuk, hogy a lymphomasejtekre jellemző aktív MAPK-ok közül az Erk1/2 és a JNK aktivitása a TGFb kezelést követően gyorsan eltűnik, ezzel párhuzamosan kimutatható a PP2A aktivitásának fokozódása. MAPKK és PP2A gátlók in vitro alkalmazásával igazoltuk ezeknek a változásoknak a szerepét a TGFb indukált apoptotikus hatásokban.

Kimutattuk, hogy a TGFb indukált apoptotikus jelátviteli mechanizmus: a. egy alternatív útvonal, b. Smad4 független módon, c. de a PP2A foszfatáz korai aktivitásától függve, d. az Erk1/2, JNK inaktiválásával párhuzamosan zajlik. Ezek az eredményeink is arra utaltak, hogy valóban nem a TGFb jelátviteli elemek hibája áll a lymphoma sejtek megváltozott TGFb érzékenységének hátterében. Vizsgálataink arra is utaltak, hogy a vizsgált lymphoma sejtekben bizonyos túlélési faktorok, anti-apoptotikus hatások csökkenthetik a TGFb érzékenységet.

Előbbi a vizsgálatainkkal kapcsolatos eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián sikerült bemutatnunk. *Vizsgálatainkat és eredményeinket bővebben bemutattuk az Exp Cell Research folyóiratban közölt cikkünkben. (Sebestyén A, Hajdu M, Kis L, Barna G, Kopper L: Smad4-independent, PP2A-dependent apoptotic effect of exogenous transforming growth factor beta 1 in lymphoma cells. Exp Cell Res. 313:3167-74, 2007; IF: 3,777)*

Mások és saját korábbi eredményeink is azt igazolják, hogy a TGFb jelátviteli út egy komplex jelátviteli hálózat elemeként működik és ennek a hálózatnak az aktuális állapota jelentősen befolyásolhatja a TGFb biológiai hatásait. Ez teszi lehetővé a sejt és differenciáció függő hatásokat, vagy akár a teljesen eltérő biológiai hatásokat a különböző sejtekben (egyik sejtben –lymphoid- proliferáció gátló, míg másokban –fibroblasztok- a proliferációt segítő).

További munkáinkban a TGFb érzékenység helyreállításának lehetőségeit és egyéb jelátviteli kapcsolatait vizsgáltuk lymphoma sejtekben.

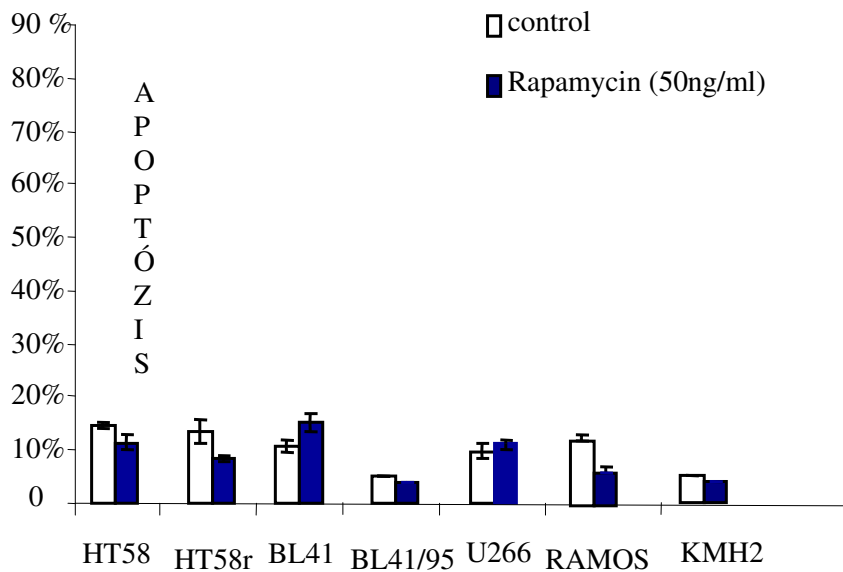
mTOR kináz gátlás a TGFb indukált biológiai hatásokban (lymphomákban)

Vizsgálataink során a TGFb egyik endogén negatív szabályozójához, az FKB12-höz is ismertén kötő, immunszuppresszív vegyület, a rapamycin hatásait kezdtük vizsgálni. A rapamycin az mTOR (a mammalian target of rapamycin) kináz, specifikus gátlószere. Az mTOR számos jelátviteli útvonal fontos elemeként vesz részt a sejtek növekedésének, anyagcseréjének (tápanyagellátás, fehérjeszintézis, proliferáció) szabályozásában. Napjainkban egyre több daganat típus esetében válik ismertté az mTOR fokozott aktivitása és annak szerepe. A rapamycin így nemcsak a TGFbR mediált folyamatok endogén szabályozásának felfüggesztésén, hanem az mTOR függő anti-apoptotikus folyamatok gátlásán keresztül is segítheti a TGFb indukált proliferáció gátló és apoptotikus hatások megjelenését.

A rapamycin jól ismert, a klinikumban is alkalmazott immunszuppresszív terápiás szer. talán éppen ezért meglepőek voltak a kezdeti eredményeink, hogy egyik az általunk tesztelt lymphoma sejt vonal esetén sem tudtunk rapamycin indukált apoptózist kimutatni in vitro (1.

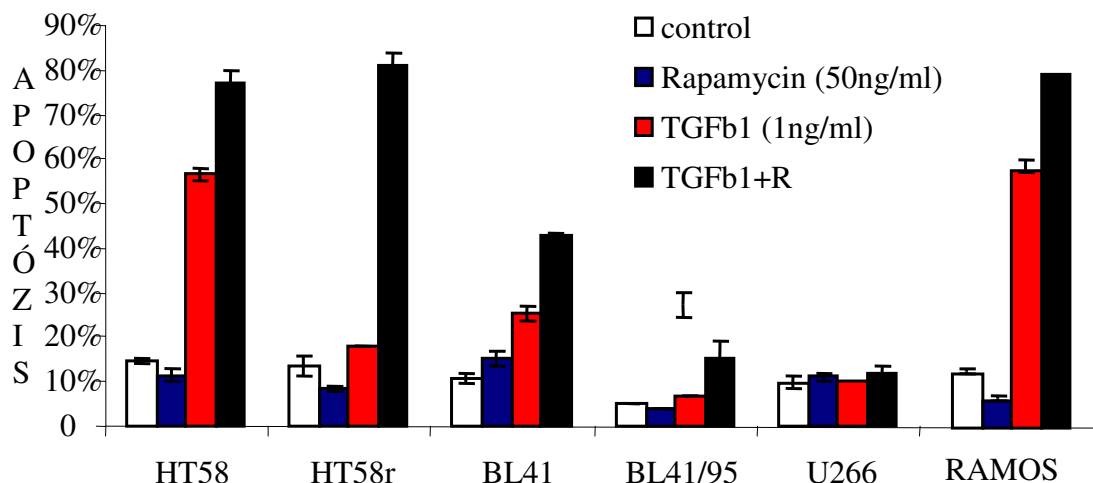
ábra). Valamennyi esetben, még a megfelelő klinikai dózisok többszörösének in vitro alkalmazása esetén is csak maximum enyhe proliferáció gátlást tapasztaltunk.

1. ábra Különböző lymphoma sejtvonalakban a rapamycin apoptotikus hatása 72h után



Az általunk vizsgált lymphoma sejtvonalaknak TGFb érzékenysége is eltérő. Megfigyeltük, hogy bizonyos a TGFb apoptotikus hatásaival szemben rezisztens lymphoma sejtek esetében a rapamycin kombinációs kezelés felfüggesztette a TGFb rezisztenciát, míg más esetekben képes volt fokozni a TGFb apoptotikus hatását (2. ábra).

2. ábra A rapamycin és TGFb kezelés apoptotikus hatása



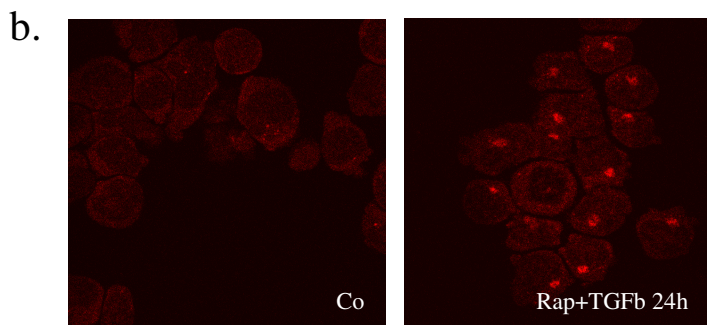
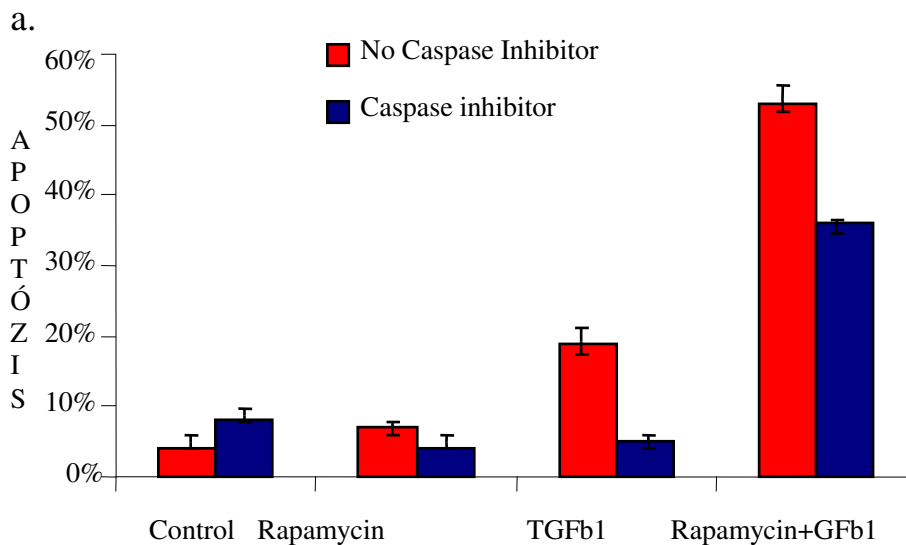
Ez a hatás időfüggést mutatott, de a TGFb vagy rapamycin időbeni előkezelésének nem volt jelentősége a kiváltott hatás mértékében, ezért a két szert egy időben adtuk a tenyészetekhez. Korábbi eredményeink alapján felmerült ennek a hatásnak a Smad4 függése, az alternatív és elsődleges TGFb jelpályák jelentősége, így ezek jellemzése. Smad siRNS transzfektált HT58 lymphoma sejtekben, különböző foszfatáz gátlók jelenlétében is megvizsgáltuk a TGFb+rapamycin apoptotikus hatását. Eredményeink szerint ez az apoptotikus jelpálya megegyezik a korábban jellemzettel, Smad4 független, PP2A függő útvonal. A rapamycin+TGFb indukált apoptózist folyamatát is jellemeztük. Vizsgáltuk a folyamat

caspase3 függőségét, míg a TGFb indukált apoptózist caspase3 gátlóval teljesen fel tudtuk függeszteni, addig a TGFb+rapamycin kezelés apoptotikus hatásának egyrésze caspase3 függetlennek bizonyult. Az elvégzett MAPLC3 immunfestések alapján feltételezhetjük, hogy rapamycin+TGFb hatására nemcsak klasszikus apoptotikus folyamatok jelentek meg a sejtekben, hanem az autofagoszómák fokozott aktivitása és az autofágia által mediált sejtelhálási folyamatok is (3.ábra).

3.ábra

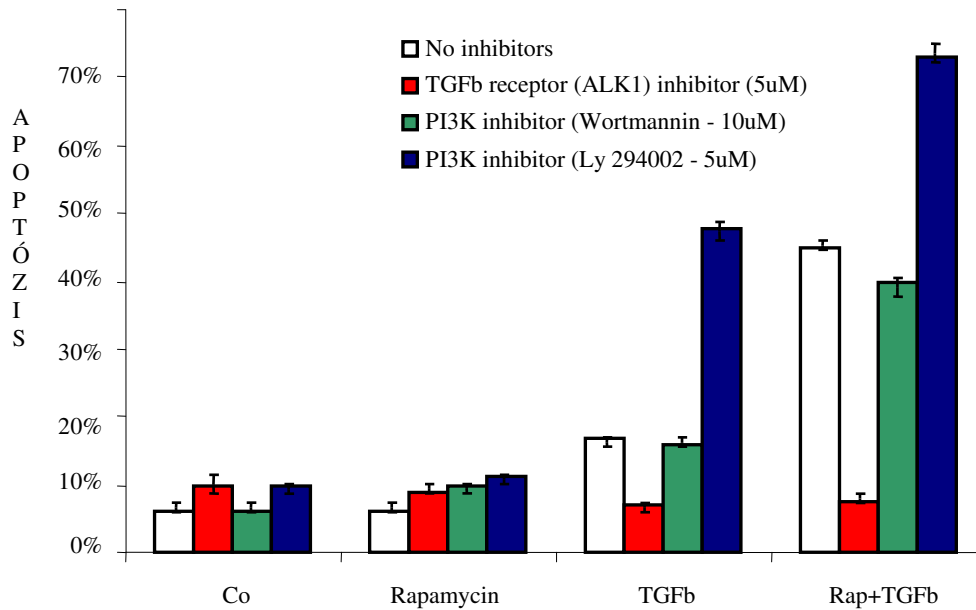
a. Caspase3 gátló hatása TGFb+rapamycin indukált apoptózisban

b. MAPLC3 (piros) fluoreszcens immuncytokémia TGFb+rapamycin kezelt HT58 sejtekben



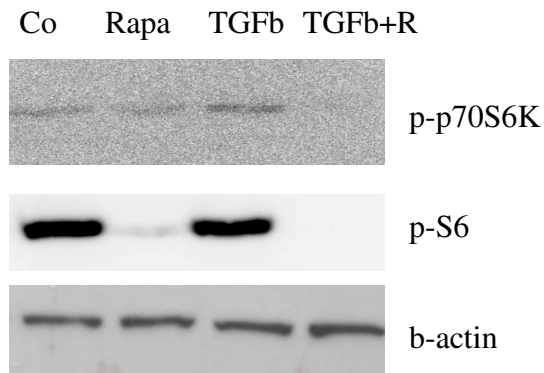
Mivel az mTOR egyik fontos aktivátora a PI3K, megvizsgáltuk különböző PI3K gátlók hatását is a TGFb illetve TGFb+rapamycin indukált hatásokban. Az Ly294002 PI3K inhibitor a rapamycinhez hasonlóan fokozta a TGFb hatását, sőt a TGFb+rapamycin kezelés apoptotikus hatását is képes volt szignifikánsan fokozni. Érdekes, hogy a Wortmannin egy másik jól ismert PI3K inhibitor nem mutatott hasonló hatást (Ennek hátterében a két inhibitor hatásmechanizmusának különbségei lehetnek, a Wortmannin elsősorban a PI3K/Akt útvonalat gátolja, míg a másik inhibitor teljesebb hatású, más aktivitásokat is felfüggeszt, a HT58 sejtekben egyébként nincs jelentős Akt aktivitás) (4.ábra).

4.ábra PI3K gátlók hatása a TGFb és TGFb+rapamycin indukált apoptózisban



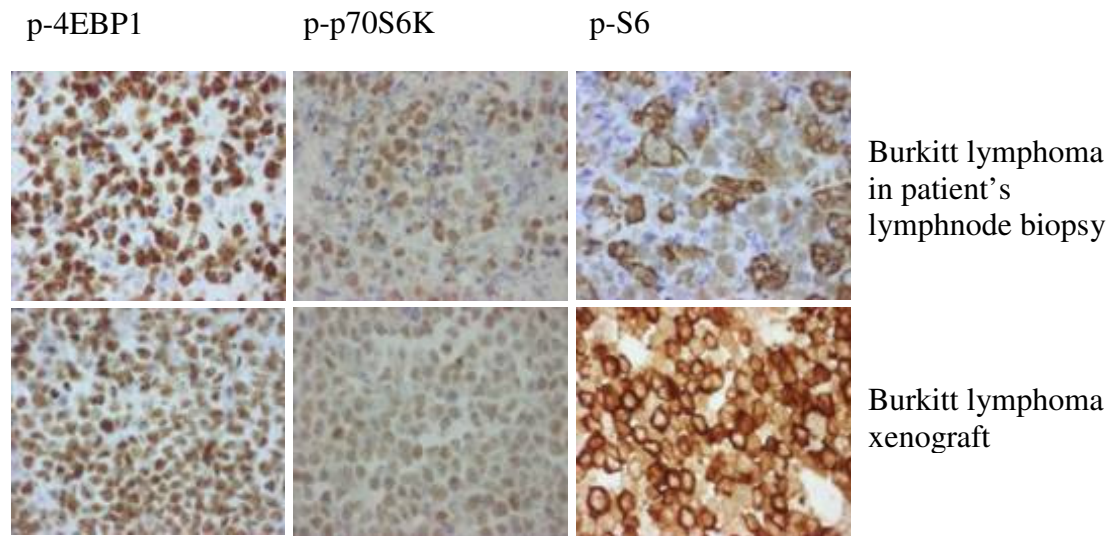
In vitro vizsgálatainkban a lymphoma sejtek mTOR aktivitását is megvizsgáltuk a TGFb+rapamycin kezelések során. Eredményeink szerint sem a rapamycin, sem a TGFb nem képes önmagában az mTOR target fehérjék aktivitásának teljes felfüggesztésére, viszont a két szer kombinációja teljesen felfüggeszti az mTOR függő aktivitásokat (5.ábra).

5.ábra p-p70S6K és p-S6 mennyiségének változása lymphomasejtekben rapamycin és TGFb kezelés után (Western blot)



Megvizsgáltuk az általunk modellként használt HT58 humán NHL sejtvonal (Burkitt lymphoma) xenograft mintáiban és Burkitt lymphomás beteg biopsziás mintáiban az mTOR kináz aktivitására utaló fehérjék in vivo expresszióját. Mindkét esetben jelentős mTOR aktivitást mutató daganatsejteket találtunk (6.ábra).

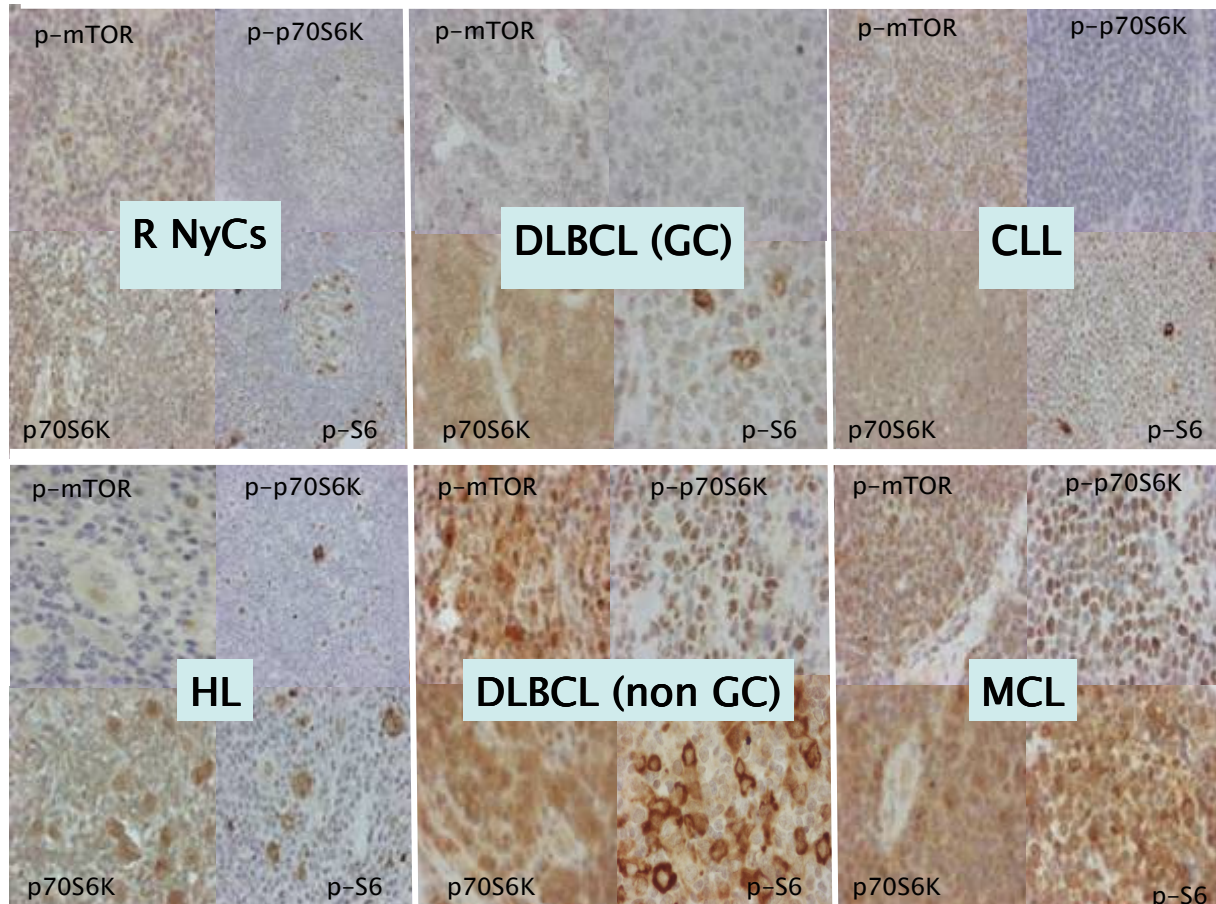
6. ábra mTOR aktivitást jellemző phospho-proteinek expressziója biopsziásmintákban (immunhisztokémia)



Ezek után számos humán lymphoma biopsziás mintájában kezdtük meg az mTOR aktivitás meghatározását. A lymphomákon elvégeztük a p-mTOR, p-p70S6K, p-4EBP1, p-S6, p70S6K immunfestéseket. Eredményeink szerint bizonyos lymphomák esetében magas mTOR aktivitás figyelhető meg (Burkitt, nem GC DLBCL, ALCL, Hodgkin, lymphoplasmocytás lymphoma, köpenysejtes lymphoma) (7.ábra). Eredményeink alapján a Hodgkin sejtek mTOR aktivitásának további in vitro és immunhisztokémiai vizsgálatát kezdtük meg. *A lymphomák mTOR aktivitásának jellemzéséről, a klinikai adatok összegyűjtését és elemzését követően egy kézirat közzétételét tervezzük.* Emellett In vivo kísérletekben megkezdtük a rapamycin lymphoma ellenes hatásának vizsgálatát, ehhez a már rendelkezésünkre álló NHL lymphoma xenograftok mellett létrehoztunk egy Hodgkin lymphoma xenograft modellt a KMH2 lymphoma sejtvonal segítségével.

A TGFb+rapamycin indukált apoptotikus hatásokról és mechanizmusáról részletes eredményeinket közzétételre elküldtük a Hematologica c. folyóiratba Synergy or more in TGFb and rapamycin induced apoptotic effect in human high grade lymphoma cells címmel (szerzők: Sebestyén Anna, Hajdu Melinda, Márk Ágnes, Varga Viktória, Nemes Karolina, Barna Gábor, Kopper László), jelenleg a kézirat elbírálás alatt van.

7.ábra Különböző biopsziás mintákban az mTOR aktivitását jellemző fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatából néhány reprezentatív eredmény (RNyCs-reaktív nyirokcsomó, DLBCL-Diffúz nagy B sejt lymphoma, GC/non-GC-Csíra centrum eredetű/nem csíra centrum eredetű, CLL-chronicus lymphocytás leukémia, HL-Hodgkin lymphoma, MCL-Köpenysejtes lymphoma)

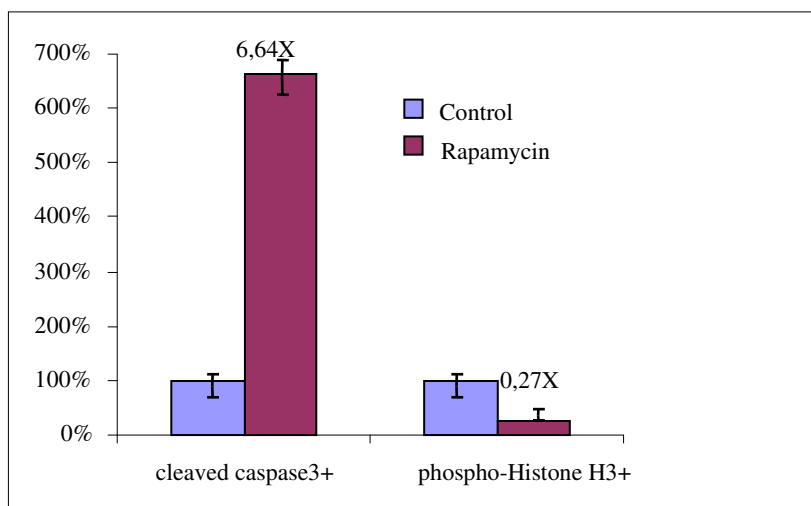
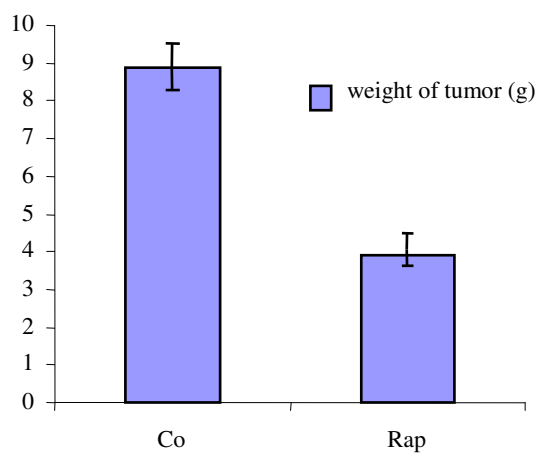


In vivo kísérleti eredmények

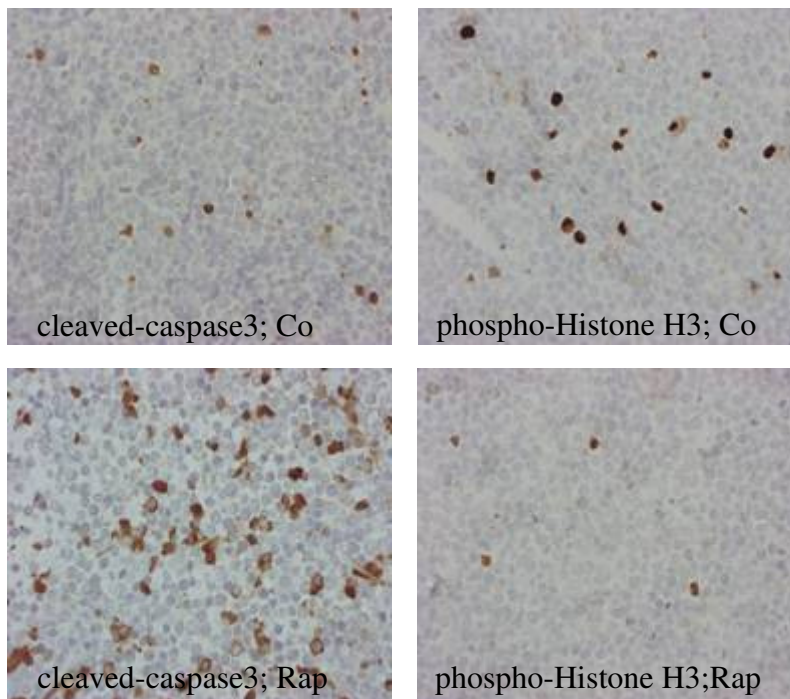
A különböző TGF β érzékenyséű NHL sejtvonalakból indított xenograftokon vizsgáltuk a rapamycin és egy másik immunszuppresszív terápia szer a mycophenolsav daganatnövekedést gátló hatásait. A mycophenolsav vagy mycophenolat mofetil sejtproliferáció gátló és apoptózist indukáló hatásának jellemzése alapján, közleményünkben, felvetettük a mycophenolsav poszttranszplantációs lymphomák kezelésében javasolt alkalmazását, hiszen ennek a szernek a választása nemcsak a poszttranszplantációs lymphoma kezelését, de a graft védelmét is szolgálja. Ezekről az eredményeinkről részletesen a Leukemia Research-ben megjelent közleményünkben számolunk be (Végső Gy, Sebestyén A, Paku S, Barna G, Hajdu M, Tóth M, Járay J, Kopper L: Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Res.* 31:1003-8, 2007; IF: 2,483). A rapamycin a mycophenolsavhoz hasonlóan, az in vitro eredményekkel ellentétben már monoterápiában is váratlanul hatásosnak bizonyult (tumor mérete jelentősen csökkent a jól tapinthatóan megjelent tumor két heti kezelését követően). Sőt a kezelést követően eltávolított tumorok morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálata alapján

egyértelmű, hogy in vivo a rapamycin nemcsak proliferációgátló hatású, hanem a spontán apoptózis mértékét is jelentősen (több mint 6-szoros emelkedés) fokozta (8-9.ábra). Ezek az eredményeink azt sugallják, hogy a rapamycin in vivo valamely a lymphoma számára jelenlevő negatív szabályozó hatásnak beindításával (akár a TGFb, akár más szabályzó), bizonyos anti-apoptotikus hatások felfüggesztésével vesz részt a daganatsejtek pusztításában. Ennek pontosabb hátterét még a továbbiakban vizsgálni fogjuk. Megvizsgáltuk in vivo a rapamycin és rituximab kombinált kezelést is B sejtes NHL xenograft esetében. Vizsgálatainkban a két szer önmagában is jelentős tumor növekedés gátlást okozott, de a kombinált kezelés lényegesen fokozta az eredeti hatásokat (kontrol tumorok átlagsúlya: 6,5g, rapamycin kezeltké 3,1g, rituximab kezeltké:3,5g, kombinált kezelés után:2,2g).

8. ábra HT58 xenograft tumorok mérete 2 hét rapamycin (rapamune heti 5x3mg/tskg) kezelés után, illetve az előbbi caspase-3 és phospho-histone H3 immunhisztokémiai festések kiértékelése

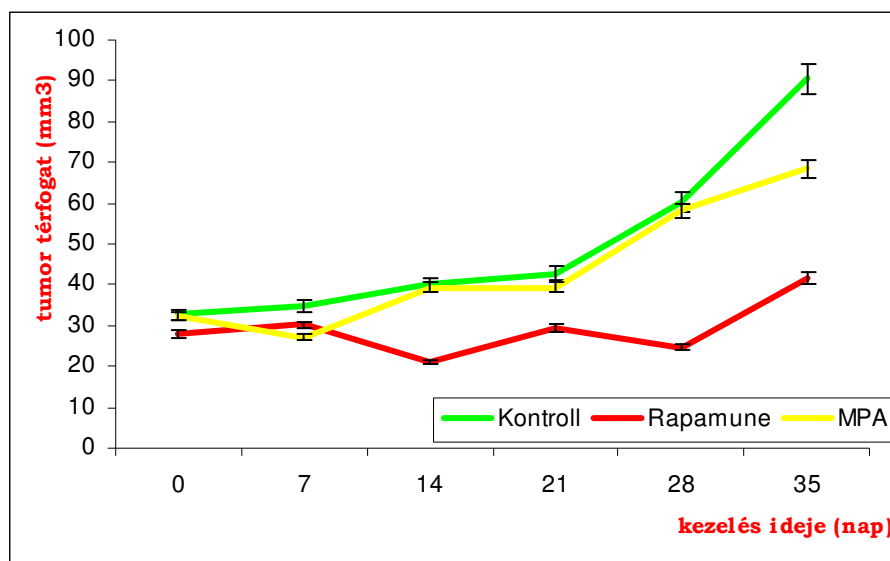


9.ábra HT58 xenograft tumor 2 hét rapamycin (rapamune heti 5x3mg/tskg) kezelés után, (cleaved-caspase3 – apoptosis marker, phospho-Histone H3 – mitosis marker)



Vizsgálatainkat Hodgkin lymphomák in vivo xenograft modelljeiben is megkezdtük, és mindkét szer esetében hasonló daganatnövekedést gátló hatásokat regisztráltunk, amely a rapamycin esetében lényegesen kifejezettebb (10.ábra). Ezek az in vivo eredmények mindenképpen megerősítik azt a feltevést, hogy a rapamycin hatékonyan segítheti különböző mTOR aktivitást mutató lymphomák kezelését, abban az esetben amikor a hagyományos protokollok mellett a daganat kiújul vagy a kezelés mellékhatásait a beteg rosszul tolerálja (rapamycin mellett az alkalmazott terápiás kezelés dózisa esetleg csökkenthetőek és a hatás nem csökken, míg a rapamycin mellékhatásai jobban tolerálhatóak). A jövőben folytatni kívánjuk in vivo xenograft kísérleteinket (egyéb kemoterápiás szerekkel és különböző dózisok vizsgálatával) és részletesebben vizsgálni kívánjuk az eltávolított xenograft tumorok illetve további human lymphomák mTOR aktivitását és klinikai jellemzőit.

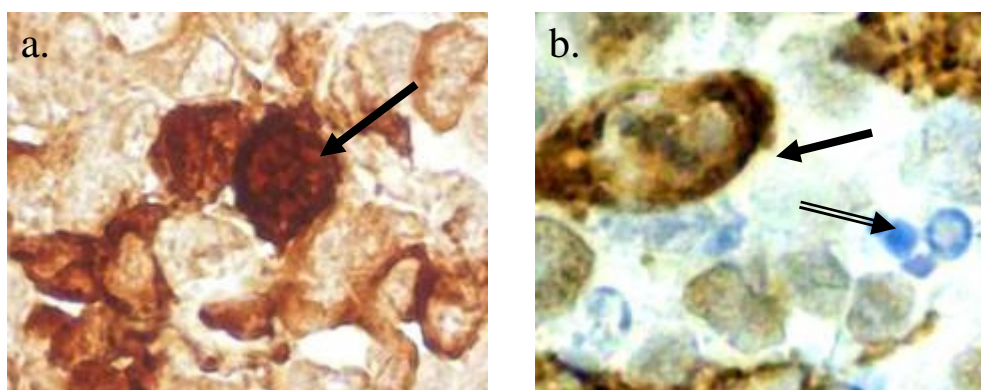
10.ábra Mycophenolát mofetil (mycophenolsav – MPA 6x100mg/tskg/hét)) illetve rapamune (rapamycin 5x3mg/tskg/hét) kezelés gátolja a KMH2, Hodgkin lymphoma xenograft tumor növekedését



pS6 és a mitózis

Az előbbieken említettem, hogy normál és reaktív nyirokcsomók, valamint lymphomák biopsziás mintáiban vizsgáltuk a PI3K-Akt-mTOR útvonal egyes fehérjéinek (úm. mTOR, S6K, S6, 4EBP1 stb.) aktivációs állapotát. Az előbbi vizsgálat során megfigyeltük, hogy az osztódó sejtekben az S6 fehérje aktív, foszforilált formájának mennyisége a nyugvó sejtekhez képest rendkívül magas (11.ábra).

11.ábra pS6 immunhisztokémia reaktív nyirokcsomó (a.) és kezelt beteg Burkitt lymphoma (b.) biopsziás mintán (Az osztódó sejtek magas pS6 mennyiségén (fekete nyíl) túl az apoptotikus alakok (üres nyíl) pS6 negativitása is megfigyelhető).

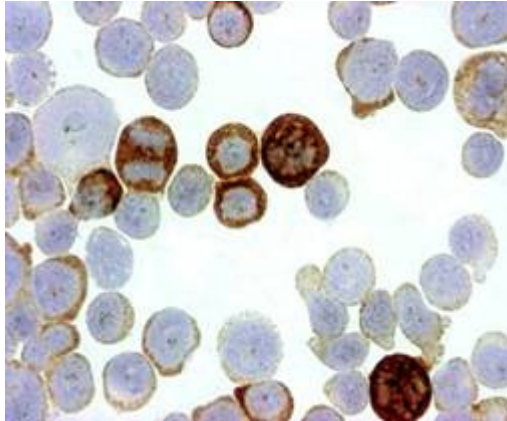


Felmerült, hogy a TGFb érzékenység vesztés és mTOR aktivitás kapcsán egy érdekes, eddig nem ismert jelenségre és egy új, a phospho-Hisztón H3-hoz (pHH3) hasonló általános mitózismarkerre találtunk. Munkánkban ezért vizsgáltuk az S6 fehérje aktivitási állapotát a különféle osztódó tumorsejtekben. Célunk annak felderítése volt, hogy: a. A megfigyelt fokozott S6 aktivitás valóban a mitotikus sejtek jellegzetessége-e?; b. Ha igen, akkor

mennyire általános jelenség ez?;c. Megfigyelhető-e esetleg egyéb, nem lymphoid sejt- és szövetfélésekben is?

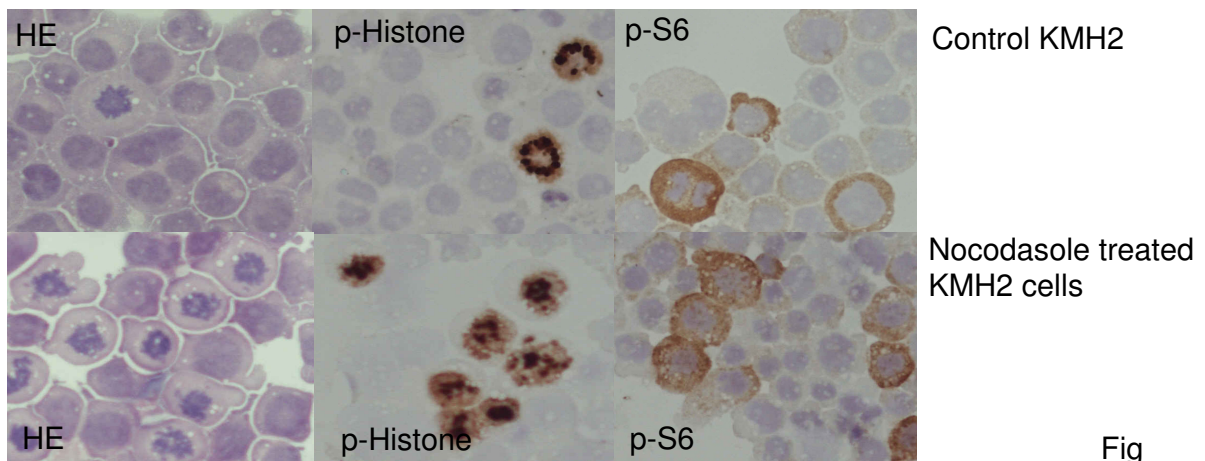
A jelenséget a legkülönbözőbb lymphoma sejtvonalak cytospin preparátumain is megfigyeltük (12.ábra).

12.ábra CEM (pS6 immunfestés), emelkedett pS6 tartalom a profázisos, anafázisos osztódó alakokban és az éppen szétváló utódsejtekben is megfigyelhető

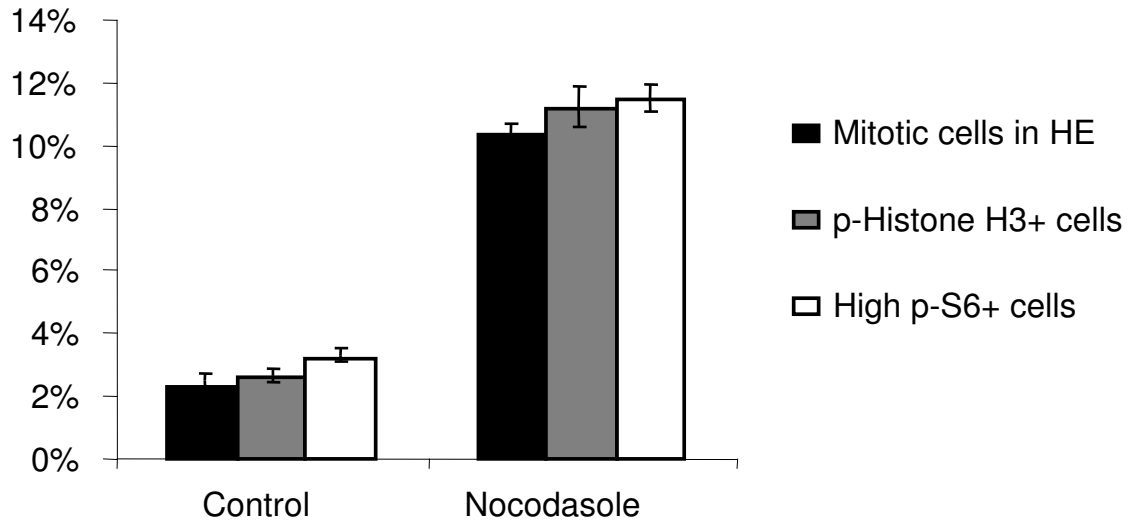


A jelenség mitózis specificitását egy ismert mitózis marker, a pHH3 festések segítségével igazoltuk. Az osztódó sejtek fenotípusának azonosításához kontroll és nocodazole-kezelt (mitózisban blokkolja a sejtciklust) KM-H2 sejtek cytospin preparátumain HE, pS6 és pHH3 immunfestést végeztünk. A nocodazole hatására a HE festés alapján mitotikusnak látszó (kondenzált kromatinállomány), illetve a pHH3 pozitív (biztosan mitotikus), valamint a pS6 pozitív sejtek száma is nagy mértékben emelkedett. A párhuzamosan festett cytospin készítményeken lemezenként 300-300 sejtet leszámolva meghatároztuk a hematoxylin-eozin festés alapján mitotikus, illetve a pS6-pozitív és pHH3-pozitív sejtek százalékos arányát. A kontroll készítményben mindhárom érték 2-3% körül volt, addig nocodazole hatására 10-12%-ra emelkedett. A mitotikus alakok, a pHH3 pozitív és pS6 pozitív sejtek százalékos arányának párhuzamos változása, magas korrelációja egy indirekt bizonyíték a mitotikus sejtek kifejezett S6 foszforilációjára (13-14.ábra).

13.ábra Kontrol és nocodazol kezelt KMH2 lymphoma sejtek pHH3 és pS6 festése

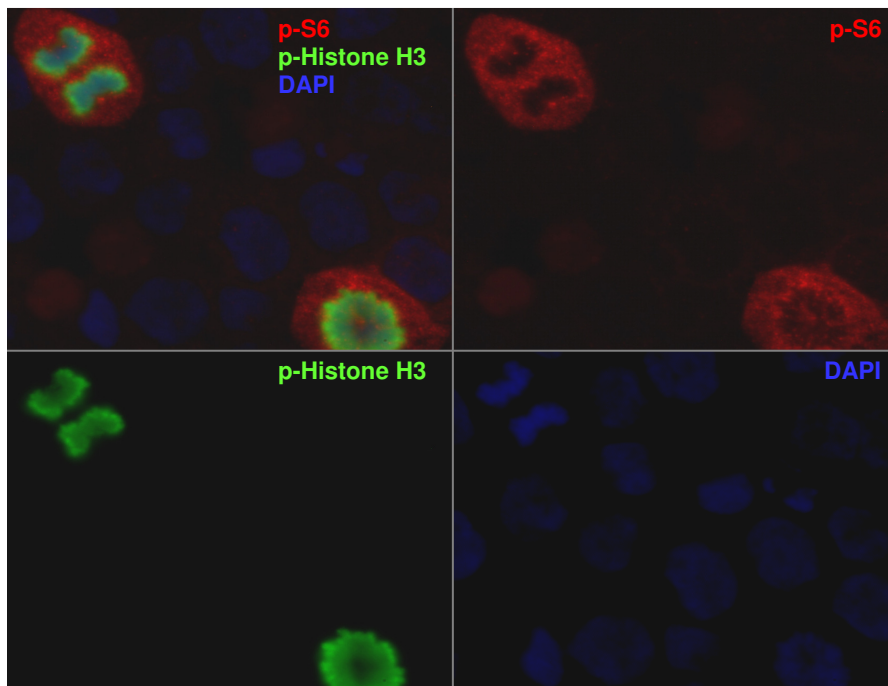


14.ábra Előbbi HE, pS6 és pHH3 festett cytospin lemezek kiértékelésének ábrázolása



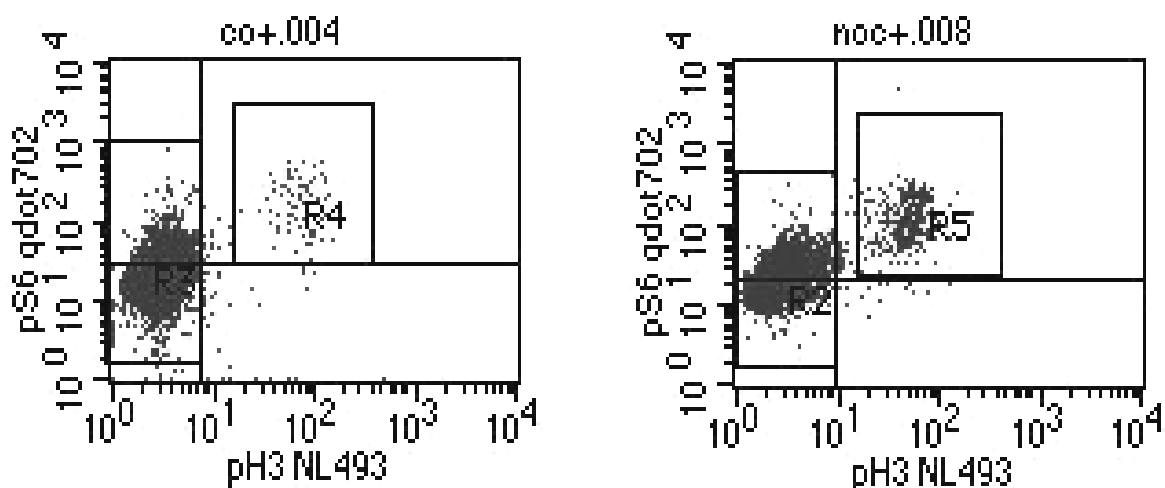
Fluoreszcens mikroszkóp segítségével direkt módon is bizonyítottuk a pHH3 és a pS6 együttes előfordulását (ko-expresszió) az osztódó sejtekben. Az osztódó sejtekben a DAPI-val festett kék kromoszómák körül intenzív, zöld pHH3 jelölődés, illetve nagy mennyiségű, pirosan jelzett pS6 látható. Az interfázisos sejtek gyakorlatilag csak DAPI-val jelölődnek és csak enyhe pS6 festést lehet megfigyelni bennük (15.ábra).

15.ábra Fluoreszcens immuncytokémia KMH2 lymphoma sejteken



A pS6 és a pHH3 együttes előfordulása a mitotikus sejtekben áramlási citométer segítségével is igazolható volt. Az 16. ábrán a függőleges tengely a pS6-, a vízszintes pedig a pHH3 pozitivitásnak felel meg. A *baloldali* ábra a kontroll, a *jobboldali* pedig nocodazole-kezelt lymphomasejtekkel készült immunfestés áramlási citometriai eredményeit mutatja. A kontroll, kezeletlen sejtek (bal ábra) esetében is megfigyelhető egy kis sejtpopuláció (jobb felső rész R4), amely kettős pS6 és pHH3 pozitivitást mutat. Nocodazole hatására megfigyelhető, hogy ez a populáció (R5) lényegesen nagyobb (jobb ábra).

16.ábra Áramlási citometriai elemzése kontroll és nocodazole kezelt lymphoma sejtek pS6 és pHH3 kettős jelölése után



Ki-„gate”-ltük a pHH3 negatív, tehát nem osztódó sejteket a kontroll és a kezelt minták esetén is ezeknek a sejteknek pS6-pozitivitását (sejtek fluoreszcencia értékeinek átlagát) ábrázoltuk a következő táblázatban (I.táblázat). A pHH3-negatív, nem osztódó sejteknél 25 egység fluoreszcencia intenzitás körüli értékeket kaptunk, míg a mitotikus (pHH3 pozitív) sejteknél lényegesen magasabb, 200 egység körülieket, függetlenül a kezeléstől. A nocodazole kezelés tehát, csak a magas pS6 fluoreszcencia festéssel rendelkező sejtek számát fokozta, de nem befolyásolta az adott mitotikus vagy nyugvó sejtek pS6 termelését. Megállapítható, hogy a mitotikus sejtek pS6 fluoreszcencia-intenzitás átlaga, egy nagyságrenddel nagyobb, mint a nem osztódó sejteké, tehát pS6 tartalma egy nagyságrenddel emelkedett.

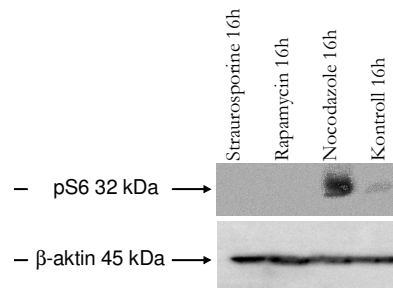
I.táblázat Kontroll és nocodazole kezelt lymphoma sejtek mitotikus és nem mitotikus populációinak pS6 pozitivitása

	mean of pS6 positivity
in control p-Histone H3 - cells	26, 38±2,43
in control p-Histone H3 + (mitotic) cells	200,58±16,56
in nocodazole treated p-Histone H3 - cells	23, 69±2,66
in nocodazole treated p-Histone H3 + (mitotic) cells	189,87±17,21

Az mTOR aktivitás szerepét a megfigyelt mitotikus pS6 expresszió háttérben pmTOR és pp70S6K immuncytokémiai festéssel vizsgáltuk. CEM sejteken nocodazole kezelést követően pmTOR és pp70S6K immunfestést végeztünk. Sajnos ezek a festések sokkal kevésbé

látványosak, mint a pS6, mivel az általunk használt pmTOR és pp70S6K ellenanyagok alapvetően paraffinos mintákra lettek kifejlesztve, és cytospinen lényegesen gyengébben működnek. Ennek ellenére azért megfigyelhető, hogy az osztódó sejtek citoplazmájának pmTOR és pp70S6K festődése is intenzívebb barna színreakciót ad, a nem osztódó sejtekénél. Nocodazole hatására az osztódó, pmTOR, pp70S6K és pS6 pozitivitást mutató sejtek aránya az előzőekben bemutatott kísérleti eredményeinkhez hasonlóan itt is lényegesen emelkedett. Az mTOR aktivitás szerepét a pS6 mennyiségének növekedésében alátámasztják Western blot vizsgálataink eredményei is. Különböző előkezeléseket (nocodazol, rapamycin, staurosporin) követően meghatároztuk a pS6 mennyiségét. A nocodazol kezelt sejtek lizátumában a pS6 fehérje mennyiségének emelkedését ki tudtuk mutatni, míg rapamycin (mTOR gátló) kezelés mellett gyakorlatilag eltűnt a pS6 expresszió, hasonlóan a G1 blokkot okozó staurosporin kezelt sejtekben kapott eredményeinkhez (17.ábra). Western blot és immuncitokémiai eredményeink szerint tehát a megfigyelt emelkedett mitotikus S6 foszforiláció valószínűleg mTOR-függő.

17.ábra Az M-blokkot okozó nocodazole lényegesen emelte, a G1-blokkot okozó rapamycin és staurosporin gyakorlatilag eltüntette az S6 foszforilációt a sejtekben (Western blot)

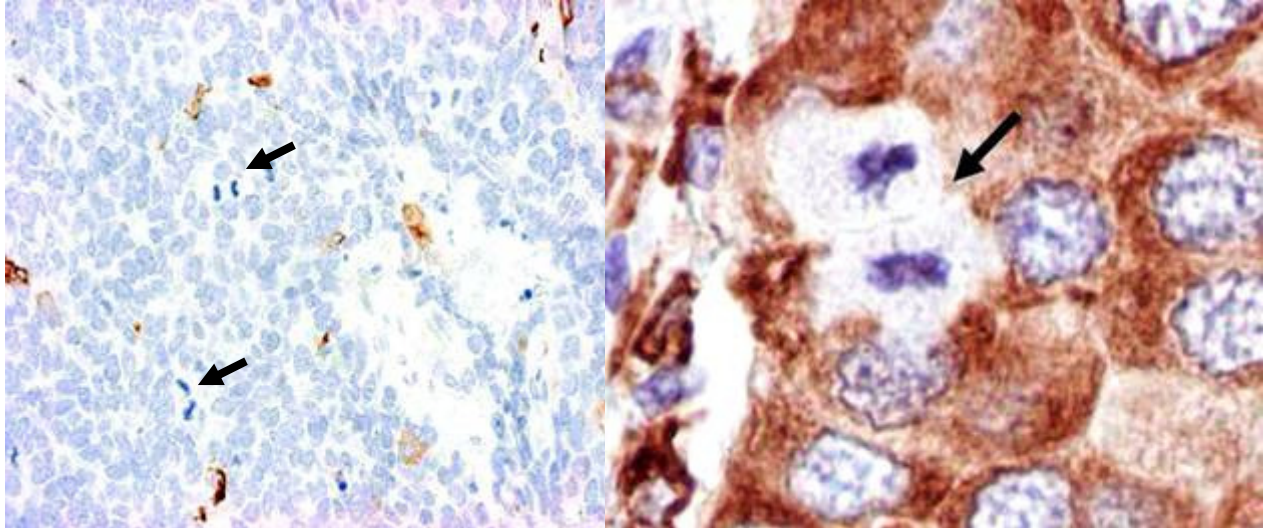


A rapamycin klinikai felhasználási területein nemrég közölt eredmények (szervtranszplantációs kezelésben a poszttranszplantációs tumorok előfordulása alacsonyabb, ill. bizonyos poszttranszplantációs tumorok esetén a rapamycin kezelésnek tumor ellenes hatása is kimutatható), valamint az a tény, hogy egyre több tumor esetében igazolják a fokozott mTOR aktivitást arra utalhat, hogy ez a mitotikus pS6 expresszió nemcsak a lymphoid és lymphoma sejtek tulajdonsága, a pS6 általánosan használható mitózis marker lehet. Előbbiek miatt megvizsgáltuk bizonyos egyéb tumorok pS6 immunfestéseit, amelyekben a mitotikus indexnek akár diagnosztikai, prognosztikai jelentősége felmerül.

Az eddig vizsgált synoviális sarcomák, emlő és colon carcinomák esetében valamennyi metszeten pS6 negatív az osztódó sarcoma és carcinoma sejteket találtunk (18.ábra). Kettős (pHH3 és pS6) festésekkel igazoltuk a jelenséget, amely szerint az osztódó lymphoma és lymphoid sejtek pS6 pozitivitása nem jellemző általánosan valamennyi tumortípusban, sejttípus függő jelenség. Mindezek alapján tovább gondolni a lymphoid és lymphoma sejtek osztódásában kimutatott pS6 emelkedés hátterét és esetleges terápiás jelentőségét.

Az előbb bemutatott eredményeinket és jelentőségét már bemutattuk különböző kongresszusokon, részleteit közlésre elküldtük a J. Leukocytes Biol c. folyóiratba Expression of phosphorylated ribosomal S6 protein in mitotic human lymphoma cells címmel (szerzők: Egervári G, Márk Á, Hajdu M, Barna G, Sápi Z, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A), jelenleg a kézirat elbírálás alatt van.

18.ábra pS6 immunhisztokémia synoviális sarcoma (bal) és emlőcarcinoma mintában (jobb). A nyilak a biztosan pS6 negatív osztódó sejteket mutatják



SLE sejtek TGFb rezisztenciájának háttere

A lymphoma sejtek TGFb érzékenységevel és a TGFb apoptotikus hatásával és szignáljával kapcsolatos munkánk során in vitro vizsgálatainkkal párhuzamosan nem hametológiai betegek (normál kontrol) és immunszuppresszív betegek keringő lymphocytáinak TGFb és TGFb jelátviteli elem expresszióját is jellemeztük. Systemic lupus erythematosus (SLE) betegek esetében kimutattuk, hogy a. az SLE-s betegek vérének plazma TGFb szintje szignifikánsan magasabb mint a kontroll személyeké; b. az SLE-s esetek több mint 50%-ában a T lymphocyták TGFb termelése megszűnik; illetve c. a TGFb jelátviteli elemek legalább egyikének (TGFbRI, Smad2, Smad3) expressziója a betegek lymphocytáiban hiányzik. Adataink azt támasztják alá, hogy elsősorban nem a lymphocyta sejtek TGFb termelésének hiánya, hanem a TGFb jelátviteli út zavara, a kóros sejtek TGFb jelátviteli elemeinek expresszió változása járulhat hozzá az autoimmun sejtek felszaporodásához.

Részletes eredményeink megjelentek a Pathology Oncology Research c. folyóiratban Kohut E, Hajdu M, Gergely P, Gopcsa L, Killián K, Pálóczi K, Kopper L, Sebestyén A: Expression of TGFbeta1 and its signaling components by peripheral lymphocytes in systemic lupus erithematosus címmel (Pathol Oncol Res., .2008 Nov Epubsahead; IF:1,241)

TGFb és a Notch jelátviteli út kooperációja

Munkánk során vizsgáltuk a transzformáló növekedési faktor béta (TGFb)- és a Notch-jelút lehetséges kapcsolódási pontjait is. A Notch-jelút patogenetikai jelentőségét számos adat támasztja alá T-sejtes akut leukémiákban, B-sejtes eredetű daganatokban azonban szerepe ellentmondásos. A jelátviteli út több tagjának mRNS-szintű expressziós mintázatát elemezve megállapítottuk, hogy a Notch-receptorok, -ligandok és a Deltex szabályozó molekula

expressziója normál B-sejtekben és B-sejtes chronicus lymphoid leukémiában (B-CLL) hasonló. A Hairy/Enhancer of Split-1 (HES-1) Notch-célgén a normál B-sejtekben általában nagyobb mértékben expresszálódik, mint B-CLL-ben. A vizsgált gének expressziós mintázata nem mutatott összefüggést a CLL klinikai és prognosztikai paramétereivel (Hajdu M, Sebestyén A, Barna G, Reiniger L, Jánosi J, Sréter L, Várkonyi J, Demeter J, Kopper L: Activity of the notch-signaling pathway in circulating human chronic lymphocytic leukemia cells. Scand J Immunol. 65:271-5, 2007; IF: 2,09). Megállapítottuk, hogy *in vitro* B-NHL sejtvonalakban a Notch-jelút gátlása (γ -szekretáz-inhibitorral; GSI) vagy ligandfüggő aktivációja (Dil4 liganddal) önmagában nem befolyásolja az apoptózis mértékét.

A két jelátviteli út együttműködését más sejtípusokban már leírták, ezért feltételeztük, hogy B-NHL-ben is létrejöhet hasonló kölcsönhatás, amely a TGF β -érzékenységet befolyásolhatja. Megállapítottuk, hogy TGF β -rezisztens sejtvonalakban sem a GSI, sem a Dil4 nem állítja helyre a TGF β -érzékenységet, TGF β -érzékeny B-NHL sejtvonalakban azonban a DAPT (γ -szekretáz-inhibitor) csökkenti a TGF β -indukált apoptózist (19.ábra). A HES-1 a TGF β transzkripcionális target génjének bizonyult TGF β -érzékeny sejtvonalakban (20.ábra).

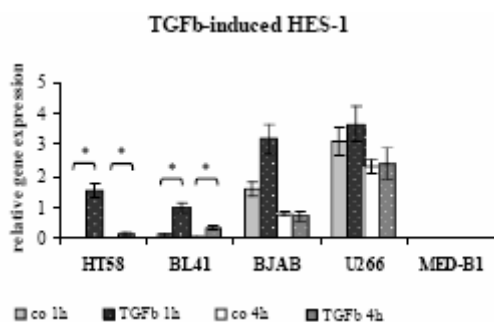
19.ábra Notch-ligand (Dil4) és Notch-jelút (DAPT) gátló hatása a TGF β indukált apoptózisban

*szignifikáns változás

apoptosis (%)	co	Dil4	DAPT	TGF β	TGF β +Dil4	TGF β +DAPT
HT58	6 \pm 3	7 \pm 2.7	6 \pm 2	30.33 \pm 5.13*	27.67 \pm 13.43	15.67 \pm 4.04**
BL41	7.9 \pm 2.8	6 \pm 3.3	5.6 \pm 2.9	26.3 \pm 2.1*	25.5 \pm 1	18 \pm 1.3**
BJAB	9.8 \pm 6.3	10 \pm 2.8	9 \pm 4.4	7.5 \pm 3.6	7.6 \pm 4.1	7.2 \pm 5.5
U266	5 \pm 3.9	5.3 \pm 2.7	4.5 \pm 3.2	6.3 \pm 5.3	5.6 \pm 4.2	4.8 \pm 3.1
MED-B1	1.5 \pm 0.5	2 \pm 1	2 \pm 0.5	2 \pm 0.2	2 \pm 0.3	2 \pm 0.2

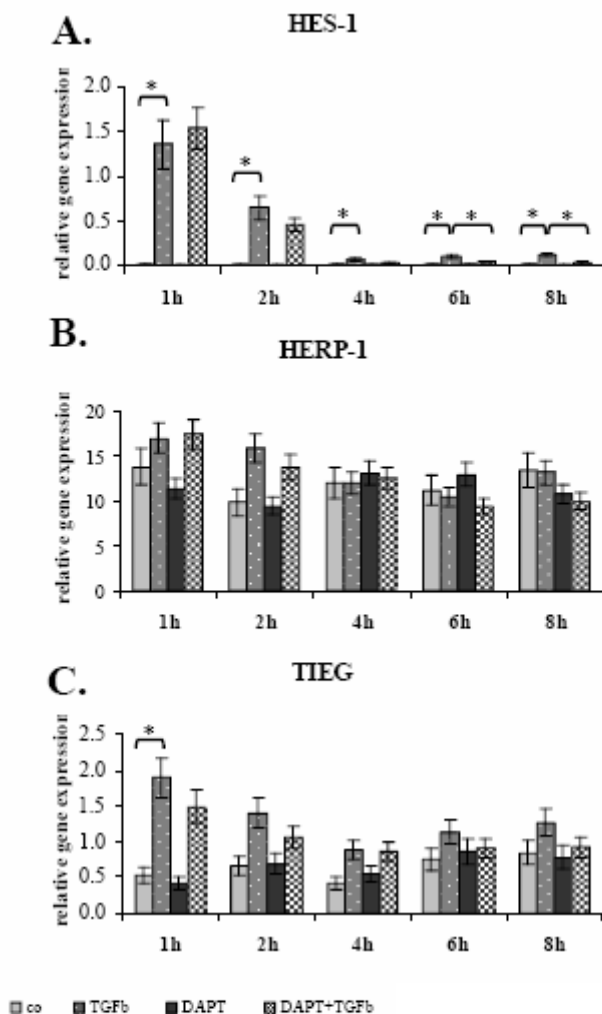
20.ábra TGF β kezelés hatása a Notch jelút target (HES-1) génjének expressziójára

*szignifikáns változás



A TGF β indukált HES-1 expressziója időben bifázisosnak bizonyult, egy és hat óránál mutatott emelkedést, és a DAPT kezelés csak a későbbi expresszió változást befolyásolta, míg a TGF β indukált TIEG, HERP1 expresszió emelkedést, valamint a c-Myc és NRARP expressziót nem befolyásolta (21.ábra).

21. ábra TGF β indukált génexpresszió változások és azok DAPT függése
 *szignifikáns változás



Adataink alapján a Notch-jelút a B-NHL sejtek apoptotikus folyamatainak szabályozásában nem játszik központi szerepet, kölcsönhatásba léphet azonban a TGF β -jelátvitellel, és módosíthatja annak hatásait. Eredményeink arra is figyelmeztetnek, hogy a Notch-inhibitorok klinikai kipróbálása előtt azok hatásának alapos, sejtípusfüggő feltérképezése szükséges. Részletes eredményeinket közlésre elküldtük a Cytokine c. folyóiratba Notch-regulation of TGF β -induced apoptosis and gene expression in human B-cell non-Hodgkin lymphomas címmel (szerzők: Hajdu Melinda, Kopper László, Sebestyén Anna), jelenleg a kézirat elbírálás alatt van.

Összefoglalva

A legtöbb daganat, így a lymphomák esetében is jól ismert, hogy a daganatsejtek elvesztik érzékenységüket negatív szabályozóikkal, például a TGF β -val szemben. A TGF β hatásában fontos jelátviteli hálózatok szerepét, a TGF β apoptotikus és proliferáció gátló hatásait vizsgáltuk in vitro és in vivo.

Kimutattuk, hogy lymphomákban a TGFb érzéketlenség hátterében nem a jelátviteli elemek expresszió változása, hiánya áll. Vizsgáltuk a TGFb és a Notch jelátviteli út kölcsönhatását. Smad4 siRNS kísérleteink segítségével leírtuk és jellemeztük a TGFb Smad4 független, PP2A függő alternatív jelátviteli mechanizmusait, amelyekkel lymphoma sejtekben aktiválhatóak a TGFb függő apoptotikus folyamatok. Kimutattuk, hogy a rapamycin képes helyreállítani, fokozni a lymphomasejtek TGFb érzékenységét in vitro, így segítheti a különböző kemoterápiás szerek hatékonyságát in vivo. Jellemeztük a rapamycin és egy másik immunszuppresszív szer a mycophenolsav hatékony Hodgkin és Non-Hodgkin lymphoma ellenes hatásait in vitro és in vivo. Kimutattuk, hogy a rapamycin képes fokozni a Rituximab hatását NHL xenograftokban. Vizsgáltuk a különböző lymphomasejtek mTOR aktivitását. Eredményeink alapján bizonyos lymphomák esetében az mTOR aktivitás potenciális terápiás célpont, gátlása segítheti a lymphomasejtekben gátolt negatív szabályozók felszabadítását, így a már alkalmazott terápiák hatékonyságának fokozását. Párhuzamosan jellemeztük más lymphoproliferatív betegségekben a TGFb érzékenység változást, a systemic lupus erythematosusos betegek lymphocytáiban a lymphomasejtekkel ellentétben a jelátviteli elemeinek expresszió változása áll a TGFb rezisztencia hátterében.

A pályázattal kapcsolatos eredmények jelentősége - közlemények

A bemutatott és összefoglalt munkánk eredményeit ennek az OTKA projekt számának feltüntetésével 3 nemzetközi folyóiratban már megjelentettük

1. Sebestyén A, Hajdu M, Kis L, Barna G, Kopper L:
Smad4-independent, PP2A-dependent apoptotic effect of exogenous transforming growth factor beta 1 in lymphoma cells.
Exp Cell Res. 313:3167-74, 2007; IF: 3,777
2. Végső Gy, Sebestyén A, Paku S, Barna G, Hajdu M, Tóth M, Járay J, Kopper L:
Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas.
Leuk Res. 31:1003-8, 2007; IF: 2,483
3. Kohut E, Hajdu M, Gergely P, Gopcsa L, Kilián K, Pálóczi K, Kopper L, Sebestyén A:
Expression of TGFbeta1 and its signaling components by peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus címmel
Pathol Oncol Res., .2008 Nov Epubsahead; IF:1,241

További három közleményünk jelenleg elbírálás alatt áll

Hematologica

Sebestyén Anna, Hajdu Melinda, Márk Ágnes, Varga Viktória, Nemes Karolina, Barna Gábor, Kopper László:

Synergy or more in TGFb and rapamycin induced apoptotic effect in human high grade lymphoma cells

J. Leukocytes Biol

Egervári G, Márk Á, Hajdu M, Barna G, Sági Z, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A:
Expression of phosphorylated ribosomal S6 protein in mitotic human lymphoma cells

Cytokine

Hajdu Melinda, Kopper László, Sebestyén Anna:

Notch-regulation of TGFb-induced apoptosis and gene expression in human B-cell non-Hodgkin lymphomas

A pályázati munkám soránlehetőségem volt egy hazai folyóiratban a TGFb daganatbiológiai szerepével kapcsolatban egy összefoglaló közlemény közlésére

Sebestyén A, Hajdu M, Kopper L:

TGFb- a Janus arcú citokin: a TGFb tumorszupresszor szerepének kettőssége
Orvosképzés 2006 3:169-183

Emellett PhD és TDK hallgatóimmal számos rangos *hazai (14) és nemzetközi (11) kongresszuson* tudtuk bemutatni a pályázattal kapcsolatos eredményeinket. TDK hallgatóim nemcsak hazai, hanem nemzetközi TDK konferenciákon is számos első Díjat szereztek (*3 első díj a Semmelweis Egyetem TDK Konferenciáin 2006-, 2008-, 2009-ben, I díj az Európai Diák Konferencián Berlinben 2008-ban, a legjobb külföldi előadó díja a Marosvásárhelyi TDK Konferencián 2008-ban*), részben ezek elismeréseként 2009-ben megkaptam a *Semmelweis Egyetem Kiváló Tudományos Diákköri Nevelő* kitüntetését.