

„A tumorsejtek szabályozási zavarai – a diagnózis és a terápia alapja” c. OTKA project (49887) zárójelentése a 2005-2007-ben végzett munkáról

Ez a jelentés elsősorban a 2007-ben végzett munkákat mutatja be, így az előző két év jelentései is tartalmazznak információkat a projekt keretében végzett szakmai munkával kapcsolatban.

Jelátviteli utak vizsgálata

TGFb jelút. - Különböző lymphomákban megvizsgáltuk a pSmad2, pSyk, pIkBa, c-Myc, Mcl-1, pMnk, p65NFkB, p50NFkB fehérjék expressziós mintázatát. Mnk aktivitás jeleit csak az ALCL-ek és a BL-ek esetében, míg c-Myc fehérje magi expressziójának hiányát csak a HL esetében tudtuk kimutatni. Emellett a pSmad2 magas expressziója minden lymphoid és lymphoma sejtekben kimutatható volt és a pSyk és p65NFkB expresszió nem mutatott jelentős különbségeket a különböző lymphomákban,. Vizsgálataink alapján bizonyos (IkBa – MCL, MZL; C-Myc - HL) fehérjék expressziós jellegzetességeit érdemes nagyobb esetszámú lymphoma csoportokon is jellemezni.

A TGFb Smad4-független apoptotikus hatásait vizsgáltuk tovább és kimutattuk, hogy ez az apoptotikus hatás rapamycinnel fokozható. In vivo és in vitro teszteltük a MMF/MPA lymphoma ellenes hatásait különböző TGFb érzékenyséű lymphoma sejtekben. Adataink szerint ezeknek a szereknek nemcsak proliferációt gátló, de apoptózist indukáló hatása is hozzájárul a lymphomák növekedésének gátlásához.

SLE-s betegek izolált T-sejtjeinek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a TGFb szignálút bizonyos elemeinek a hiánya az esetek több mint 50%-ára jellemző. Ez feltehetően hozzájárul a beteg sejtek immunológiai funkció zavarához.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgatók: Barna Gábor, Hajdú Melinda, Végső Gyula.)

Notch-jelút – A TGFb és a Notch jelút kapcsolatának vizsgálata közben jellemeztük a két útvonal célgénjeinek expresszióváltozásait lymphoma sejtekben TGFb, γ -szekretáz gátló és Delta ligand kezelések után. Kimutattuk, hogy a HES-1 a TGFb transzkripcionális célgénje lehet a TGFb-érzékeny B-NHL sejtvonalakban. A TGFb-indukált HES-1 indukció korai fázisát a γ -szekretáz-inhibitor (DAPT) nem gátolta, a későbbi fázisban a HES-1 expresszióját részben csökkentette. A HES-1 expressziónövekedés mértéke jelentősen meghaladta a TIEG expresszióváltozását, amely a klasszikus TGFb-jelút korai célgénje. A Dll4 ligand és a DAPT csak egy TGFb rezisztens B-NHL lymphoma sejtvonalonban szignifikánsan megváltoztatta a HES-1 expresszióját. A HERP-1, NRARP és C-MYC mRNS mennyiségét azonban a TGFb, a Dll4, és a DAPT nem befolyásolta.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgató: Hajdú Melinda.)

EGFR-jelút - Kísérleteink során négy EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) tirozin-kináz gátlóval szemben rezisztens tüdőrák sejtvonalat vizsgáltunk: H358-as vonal RAS mutációt és vad típusú EGFR-t, a H1666 vonal vad típusú RAS és EGFR géneket, de mutáns RAF-ot, a H1650 az EGFR aktiváló mutációját tartalmazza a 19-es exonban, a H1975-ös vonal az EGFR 21-es exon aktiváló mutációját és a EGFR-gátlószer rezisztenciát okozó mutációt (20-as exon) hordoz. Már az előző jelentésünkben beszámoltunk róla, hogy az EGFR-t aktiváló tirozin kináz domén mutációt tartalmazó sejtvonalak rezisztensnek bizonyultak a TRAIL halálligand kezeléssel szemben, míg a RAS és RAF mutáns vonalakban a TRAIL apoptózist indukált. További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az EGFR-

jelátviteli útjának a gátlásával helyreállítható-e a TRAIL érzékenység az EGFR mutáns sejtvonalakban (H1975 és H1650). Feltételeztük, hogy a korábban leírtak megfelelően a mutáns EGFR receptor fokozottan aktiválja a PI3K/AKT útvonalat ami több ponton gátolhatja az apoptózist. Az EGFR gátlószerek, mint a gefitinib vagy az erlotinib nem fokozta a TRAIL érzékenységet ami magyarázható a H1975 esetében a gyógyszerrezisztenciát okozó T790M mutáció jelenlétével. A H1650 esetében a PTEN tumorszuppresszor gén deléciója autonóm PI3K/AKT jelátviteli út aktivációt hoz létre, ami független a receptortól. Ezért második lépésben a PI3K gátló LY294002 hatását teszteltük a négy sejtvonalon. Mindkét EGFR mutáns TRAIL érzékenysége szignifikánsan emelkedett míg a RAS és RAF mutáns sejtek TRAIL érzékenysége nem fokozódott tovább. Az AKT egyik fontos „downstream” apoptózisgátló jelátviteli útja az IKK kináz aktivációján keresztül valósul meg. Ezért a Vichem Kft. által előállított IKK gátló hatását is megvizsgáltuk és azt találtuk, hogy az IKK gátló a PI3K gátlónál még hatékonyabban fokozta az EGFR mutáns sejtek TRAIL érzékenységét. Összefoglalva: Eredményeink alapján az EGFR és a RAS, RAF és PTEN molekuláris diagnosztikájával a TRAIL adásán alapuló terápiák hatásossága előre jelezhető lehet. Továbbá azonosítottuk az IKK kinázt, mint fontos terápiás célpontot a TRAIL rezisztencia leküzdésére.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgatók: Barti-Juhász Helga, Magos Krisztián, Moskovszky Linda, Nagy Katalin.)

Lymphomagenézis

A primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphomára (PMBL), egyéb csíracentrum eredetű daganatokhoz hasonlóan, fokozott aktiváció indukált citidin deamináz (AID) expresszió és következményes Aberráns szomatikus hipermutáció (ASHM) jellemző. Eredményeink alapján A PMBL-ben tapasztalt AID expresszió és az ASHM megléte közötti kapcsolat arra enged következtetni, hogy az AID által indukált mutagén hatás szerepet játszhat ennek a betegségnek a kialakulásában.

Bizonyítottuk az AID expresszió és az ASHM krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) Richter (RT) és prolymphocytás transzformációjában (PLT) betöltött szerepét. A nem-transzformálódó CLL-es esetekhez képest az RT és PLT esetekben magas AID expressziós szinteket detektáltunk, valamint c-MYC, a Pax5 és a RhoH gének ASHM általi érintettségét is kimutattuk a transzformáción átesett esetekben. Eredményeink arra utalnak, hogy a fokozott AID expresszió és az ASHM összefüggenek a CLL magasabb malignitású lymphomába történő transzformációjával, és további bizonyítékot nyújtanak arra, hogy az AID expresszió és az ASHM aktiválódhat a B-sejtes lymphomák klonális fejlődése során.

A bcl-2 negatív folliculáris lymphomák (FL) molekuláris jellemzése során az AID mRNS és fehérjeszintű expresszióját is kimutattuk, továbbá az ASHM célgénjeinek mutációs státuszát is feltérképeztük. Eredményeink alapján az AID fokozott expressziója és az ASHM is hozzájárulhatnak a bcl-2 negatív FL-k patogeneziséhez.

Összefoglalva: az elmúlt három évben leírtuk az AID expresszió és az ASHM szerepét a primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma és a bcl-2 negatív folliculáris lymphomák kialakulásában, illetve a krónikus lymphocytás leukaemia Richter és prolymphocytás transzformációjában.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgatók: Bognár Ágnes, Bödör Csaba, Reininger Lilla.)

Hepatocarcinogenesis és májössejtek

Felnőtt állatok májában a Hering csatornákat felépítő hámsejtek képesek a legnagyobb valószínűséggel összejtéként viselkedni, ezért pontos szerkezetüknek immunfenotípusuknak feltérképezése fontos lehet reakcióik megértéséhez. Patkányok májában a Hering csatornákat, a többi epeúttól eltérő CK19+/CK7- fenotípusú sejtek alkotják. Funkcionális tesztekkel kimutatható volt, hogy ezek a sejtek a prekursorai a vegyszerezes kezeléssel kiváltott ovális, illetve choledochus lekötéssel indukált ún. epeútproliferációnak. A Hering csatornák a patkányok májában a periportális kötőszövetben maradnak, de azon belül hosszú, sokszor elágazódó csövecskék formájában vannak jelen. Ezzel szemben az emberi májban a Hering csatornák a hepatocyták határolólemezt átörve a parenchymába terjednek, ahol a lebenykéket elválasztó rudimenter kötőszöveti résekben, az ún. vaszkuláris szeptumokban terjedve ölelik körül a lobulusokat. Az emberi májban a Hering csatornákat az EMA-/CD56+/CD133+ immunfenotípus különbözteti meg a nagyobb epeúttaktól.

Kísérleti állatokban az acetaminofluorén/parciális hepatectomiás kísérleti rendszerben vizsgáltuk a májban levő összejtek utódainak, az ovális sejteknek a viselkedését. Immunhisztokémiai és sejtizolálási módszerekkel megállapítottuk, hogy a csontvelői összejtekre jellemző Thy-1/CD 90 antigén nem az ovális sejteken, hanem a velük szoros közelségben levő myofibroblastokon található. Ez az eredményünk összhangban van azokkal a friss irodalmi adatokkal, melyek megkérdőjelezzik az ovális sejtek tömeges csontvelői eredetét. Az ovális sejtekben kimutatható volt viszont egy újabban leírt matrix molekulának a matrillin 2-nek a termelődése. Egy másik ovális sejtes markert a dlk-1-t immunhisztokémiai módszerrel sikerült kimutatni több mint 30 humán hepatoblastomán. Ez az eredmény megalapozhatja a dlk-1 hepatoblastoma markerként való alkalmazását a diagnosztikus patológiában másrészt alátámasztja ennek a ritka tumor összejteredetre vonatkozó elképzeléseket.

Ugyanezen kísérleti rendszerrel előidézett ovális sejtek hepatocytákká történő differenciálódását lehetett felgyorsítani *in vivo* primer hepatocytá mitogénnel való kezeléssel. A differenciálódás morfológiai jelein kívül a mitogénnel kezelt állatokban a májfunkció javulása laborvizsgálatokkal is igazolható volt. Amennyiben a primer hepatocytá mitogénnel ilyen jellegű hatása más kísérleti rendszerekben is igazolható, megfigyelésünk megalapozhatja a májregeneráció klinikai befolyásolásának új megközelítését.

Patkányokban összehasonlítottuk a parciális hepatectomiát követő regeneráció során zajló szerkezeti változásokat az egyedfejlődés posztnatális fázisában zajló történésekkel. Míg a hepatectomiát követő regeneratív válasz során a májszövet kizárólag a megmaradt lebenykék növekedésével gyarapszik, a születést követő májnövekedéshez a lebenykék méretének változásán kívül a lebenykék számának és a hepatocyták méretének fokozódása is hozzájárul.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgatók: Baghy Kornélia, dr. Dezső Katalin.)

Angiogenesis

Nem kissejtes tüdőrákok (NSCLC) esetében vizsgáltuk a lymphangiogenesis összefüggését a prognózissal. 103 betegből származó mintán végeztük el két nyirokérmarker, Lyve-1 és podoplanin felhasználásával a nyirokereket morfometriai analízist, valamint a VEGF-C expresszió immunhisztokémiai vizsgálatát. A tumorokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportba az úgynevezett angiogén tumorok kerültek melyek invazív növekedésük során tüdőszövet szerkezetét jelentősen torzították és a tumor szélén jelentős vérér képződést indukáltak. A másik csoportot a nem angiogén tumorok alkották, melyek megtartották a tüdő alveoláris szerkezetét, angiogenesis indukcióját nem mutatták, vérellátásukat az inkorporált alveolusok biztosították. Normál tüdőszövetben és a nem angiogén csoportban két nyirokérmarker eloszlása megegyezett. Ezzel szemben az angiogén csoportban a tumorok

belsejében a nyirokerek Lyve-1 festődése jelentősen csökkent. Ez utóbbi csoportban a nyirokérdenzítás sokkal magasabb volt a tumor perifériáján mint a tumor belsejében, amely a nyirokerek inkorporációjára utal a tumor növekedése során. A peritumorális nyirokérdenzítés összefüggést mutatott a nyirokcsomó metasztatikus kialakulásával valamint a túléléssel. A normál szövethez képest emelkedett VEGF-C expresszió viszont nem mutatott összefüggést a nyirokérdenzítással vagy a prognózissal, azonban szerepet játszhat a tumorba belebelezett nyirokerek túlélésében.

Mikroglanduláris humán vastagbélrák (HT29) kísérletes májmetasztázisainak növekedése során az inváziós szélén a mirigyek egy része nyitott a májszövet felé, azaz bazális membrán és $\alpha 6$ integrin nem figyelhető meg ebben a régióban, azonban a tumor differenciált állapota nem változik (epiteliális-mezenchimális átmenet nem figyelhető meg). Ez a jelenség kulcsszerepet játszhat a májszövet inváziójában és a tumorba történő inkorporációjában. A folyamat során a bekebelezett szinuszoidok fúziója következik be, ami a metasztázis érhálózatának kialakulásához vezet.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgatók: László Vikória)

Extracelluláris mátrix szerepe

A syndecan-1 molekula működésének megismerésére a fehérje deléciós mutánsait vektorba klónoztuk, és ezzel transzfektáltunk emlőráksejteket. Azt találtuk, hogy egy olyan deléciós konstrukció hatására, amely az intracelluláris és transzmembrán domén mellett az első négy extracelluláris aminosavat is tartalmazta, az E-cadherin mennyisége lecsökkent, míg a teljes fehérjét túltermelő transzfektánsokban a kontroll szintjével azonos volt az E-cadherin mennyisége. Ez arra utal, hogy a syndecan-1 intracelluláris vagy transzmembrán doménje az extracelluláris domén lehasadását követően hatással lehet az E-cadherin kifejeződésére. Az is elképzelhető, hogy ez a hatás a PDZ domén szintén keresztül jut érvényre. Figyelemre méltó az is, hogy a syndecan-1 fokozza a Her2 fehérje expresszióját. A tenyésztő médiumban a syndecan-1 ektodomén mennyisége nem fokozódott a transzfektánsainkban, sőt arányaiban csökkent, ami ellene szól annak, hogy a malignitás fokozódásáért esetünkben a syndecan-1 shedding lenne felelős. A szövettenyésztési sejtek proliferációs kapacitása nem változott a transzfekciót követően, és migrációjukban sem tudtunk eltérést kimutatni, mégis egerbe oltva a syndecan-1 transzfektáns tumorok növekedési üteme fokozott volt, és ezt a képességüket átváltás után is megtartották.

(A vizsgálatokban résztvevő PhD hallgatók: Baghy Kornélia, Péterfia Bálint, Tátrai Péter.)

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. 2007 Sep 10;313(15):3167-74. IF 3,77
2. Végső G, 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. 2007 Jul;31(7):1003-8. IF 2,483
3. Kohut E., Hajdu M, Gergely P, Gopcsa L, Kilián K, Pálóczi K, Kopper L, Sebestyén A:
Expression of TGFβ1 and its signaling components by peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus. közlésre elf. IF 1,241
4. Sebestyén A, Hajdu M, Kopper L
TGFβ – a Janus-arcú citokin: a TGFβ tumorszuppresszor és tumorpromoter szerepének kettőssége. Orvosképzés 3: 169-183, 2006

A megjelent közleményeken kívül két további kézirat lett beküldve közlésre a pályázat feltüntetésével (döntés még nincs):

Viktória László, Katalin Dezső, Kornélia Baghy, Veronika Papp, Ilona Kovalszky, Géza Sáfrány, Snorri S. Thorgeirsson, Peter Nagy, Sándor Paku
Triiodothyronine accelerates differentiation of rat liver progenitor cells into hepatocytes

Veronika Papp, Katalin Dezső, Viktória László, Peter Nagy, Sándor Paku
Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat

Bödör Cs, Bognár Á, Reiniger L, Szepesi Á, Tóth E, Kopper L, Matolcsy, A. (2005) Aberrant somatic hypermutation and expression of activation induced cytidine deaminase mRNA in mediastinal large B-cell lymphoma. Brit J Haematol 129: 373-376. - IF: 4,080

Reiniger L, Bödör Cs, Bognár Á, Balogh Zs, Csomor J, Szepesi Á, Matolcsy A. (2006) Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. Leukemia, 20: 1089-1095. - IF: 6,146

Gagy E, Balogh Z, Bodor C, Timar B, Reiniger L, Deak L, Csomor J, Csernus B, Szepesi A, Matolcsy A. (2008) Follicular lymphoma without Bcl-2 gene rearrangement and expression is associated with somatic hypermutation of IgV_H genes and aberrant somatic hypermutation. (submitted to Hematologica - IF:5,032)

Varkondi E, Pinter F, Robert K, Schwab R, Breza N, Orfi L, Keri G, Petak I. Biochemical assay-based selectivity profiling of clinically relevant kinase inhibitors on mutant forms of EGF receptor. J Recept Signal Transduct Res. (2008) 28:295-306 - IF 2,0

Pinter F, Papay J, Almasi A, Sapi Z, Szabo E, Kanya M, Tamasi A, Jori B, Varkondi E, Moldvay J, Szondy K, Keri G, Dominici M, Conte P, Eckhardt S, Kopper L, Schwab R, Petak I. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) High Gene Copy Number and Activating

Mutations in Lung Adenocarcinomas Are Not Consistently Accompanied by Positivity for EGFR Protein by Standard Immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* (2008) - IF 2,9

Petak I, Houghton J, Kopper L: Molecular Targeting of Cell Death Transduction Pathways in Cancer. *Current Signal Transduction Therapy* (2006) 1.1

Nagy K, Szekely-Szuts K, Izeradjene K, Douglas L, Tillman M, Barti-Juhasz H, Dominici M, Spano C, Luca Cervo G, Conte P, Houghton JA, Mihalik R, Kopper L, Petak I. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathol Oncol Res.* (2006) 12:133-142. - IF 1,1

Nagy K, Petak I, Imre G, Barna G, Gezane-Csorba M, Sebestyen A, Houghton JA, Mihalik R, Kopper L. Proteasome inhibitors abolish cell death downstream of caspase activation during anti-microtubule drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Anticancer Res.* (2005) 25: 3321-3326. - IF 1,395