

# Az epithel- és endothelsejtek plaszticitásának jellemzése és szabályozása egyes patológiás folyamatokban

Doktori tézisek

**Dr. Gasparics Ákos**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebe Attila PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Antus Balázs PhD, DSc, osztályvezető főorvos  
Dr. Tőkés Anna-Mária, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Reusz György,  
MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Vörös Péter, PhD, osztályvezető  
főorvos

Dr. Tory Kálmán, PhD, egyetemi  
adjunktus

Budapest  
2018

## 1. Bevezetés

A szomatikus sejtek érett fenotípusának változását sejtplaszticitásnak nevezzük. Ennek során a sejtek olyan átalakulásokon mennek keresztül, amik megváltoztatják a sejtek morfológiáját, funkcióját. Tágabb értelemben idetartoznak a különböző őssejtípusok átalakulásai differenciációjuk során, illetve a fakultatív őssejtek aktivációja. A már elkötelezett, differenciált sejtek dedifferenciációja, transzdifferenciációja, vagy csak fenotípus változása is a sejtplaszticitás egy-egy formája. A sejtplaszticitás célja, hogy a különböző káros hatások ellenére fenntartsák a szervezet homeosztázisát, azonban a nem megfelelő módon zajló folyamatok a sejtek malignus átalakulását, valamint alkalmazkodását is segíthetik.

Az epithelialis és mesenchymalis sejtek fenotípusa különböző esetekben (pl. embrionális fejlődés) megváltozhat, a két állapot egymásba átalakulhat, ezt a jelenséget epithelialis-mesenchymalis transitióknak (EMT), illetve mesenchymalis-epithelialis transitióknak (MET) nevezzük. Az epithelialis-mesenchymalis transitió fiziológiásan az embrionális fejlődésben, sebgyógyulásban, patológiás esetben a metastasisképzésben, és fibrotikus folyamatokban jelenik meg. Az endothelsejtek transitióval szintén mesenchymalis sejtekké alakulhatnak, endothelialis-mesenchymalis transitió (EndMT) útján. Kísérleteink során ennek a két – egymással sok hasonlóságot mutató – folyamatnak egy-egy példáját kívántuk vizsgálni.

A krónikus vesebetegség (Chronic kidney disease, CKD) globális, illetve Egyesült államokbeli prevalenciája 13%. A kiváltó októl, és a háttérben álló betegség(ek)től függetlenül a CKD legfontosabb jellemzője a progresszív vesefibrosis. A primer vesebetegségek (krónikus glomerulonephritis, policisztás vesebetegség) mellett a járványszerűen növekvő gyakoriságú hypertonia és diabetes a CKD két vezető oka.

A CKD hosszútávon végállapotú vesebetegséghez (ESRD) vezet(het), mely vesepótló kezelést, szervátültetést tehet szükségessé. Tekintve a betegség súlyosságát, valamint gyakori előfordulását, modellezése fontos a jobb megértéshez. Szöveti jellemzőit tekintve a krónikus vesebetegség tubulointerstitialis fibrosissal jár, a tubulusok mellett a glomerulusok és a kapilláris hálózat is sérül. Vesefibrosis modellben végzett kísérletek alapján alakult ki az EMT „kettős sérülés” modellje, amely szerint az EMT folyamatához két lépés vezet. Elsőként az epithelsejtek integritásának csökkenése szükséges (első sérülés), amelynek háttérben pl. mechanikai ártalom, immunkomplex lerakódás, hypoxia állhat. A károsodott helyeken a TGF- $\beta$ 1-hatás (második sérülés) fokálisan EMT-t indukál, ez fokozott TGF- $\beta$ 1- és ECM-

termelődést eredményez, ami a környező területek károsításával és az EMT kiterjedésével járhat. A myofibroblastok jellemzőjeként az  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) a transitio végén jelenik meg. A szignáltranszdukció során a Serum response factor (SRF) kofaktoraként a Myocardin related transcription factor A-t és B-t (MRTF-A, B) azonosították. A közelmúltban leírt Suppressor of cancer cell invasion (SCAI) fehérje az MRTF-ek inhibitoraként vált ismertté.

A tumoros betegek esetében a metastasis megjelenése az esetek túlnyomó többségében terminális megbetegedést jelent. A tumorsejtek az újukba kerülő sokféle határoló elem leküzdéséhez többféle molekulát termelnek. A központi idegrendszerbe a tumorsejtek a véráram útján jutnak, de a vér-agy gáton történő áthaladás módját egyelőre nem sikerült teljesen megismerni.

Az endothelsejtek határoló funkcióját a tumorsejtekből származó citokinek – így pl. a TGF- $\beta$  – rontják, valamint az endothelsejtekben olyan szignalizációs útvonalakat aktiválnak, amelyek pl. a VE-cadherin-komplexekeket megszakítják, ennek következtében az endothelsejtek morfológiája megváltozik. Az endothelsejtekben a cytoskeleton újraszerveződését, motilitás fokozódását szintén kiválthatják a tumorsejtek. Mindezen megfigyelések az EndMT folyamatában is követhetők, így azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az endothelsejtek nem pusztán „elszenvedői” a tumoros metastasisképzésnek, hanem aktívan is részt vesznek a tumorsejtek extravazációjában. Az endothelsejtek expressziós mintázata a metastasis során megváltozik, fenotípusuk mesenchymalis irányba tolódik, kontraktilitásuk fokozódik. A változások összessége alapján feltételezhető, hogy az extravazáció során EndMT segítségével küzdik le a metasztatikus sejtek a vér-agy gát jelentette akadályt.

## 2. Célkitűzések

Csoportunk korábbi munkája során néhány olyan új jelátviteli mechanizmust jellemezett, amelyek a TGF és a kettős sérülés hatására létrejövő EMT-t és a markerként használt SMA-expressziót szabályozzák. E folyamatok központi elemének az MRTF dependens szignalizáció és fehérjeexpresszió szabályozása igazolódott. A közelmúltban felfedezett SCAI-fehérje az MRTF-ek inhibitoraként vált ismertté tumoros modellekben. Ezek alapján felmerült annak lehetősége, hogy a SCAI-fehérjének az EMT folyamatában és a vesefibrosisban is fontos szerepe lehet. Munkám egyik célkitűzése a SCAI vizsgálata volt e modellekben:

1. *In vitro* modellben vizsgálni kívántuk, hogy a SCAI hogyan befolyásolja a TGF- $\beta$ 1 és az Angiotensin II hatásait, illetve a különböző EMT-markerek expresszióját EMT során.
2. Vizsgálni kívántuk a SCAI az MRTF-A, MRTF-B, valamint a kis G-fehérjék közvetítette szignáltranszdukcióra való hatását EMT-modellben.
3. *In vitro* vizsgálni kívántuk, hogy a TGF- $\beta$ 1 kezelés, illetve *in vivo* az UUO (Unilateral ureter obstruction), valamint az allograft rejekeció kiváltotta fibrosis befolyásolja-e a SCAI-expressziót.
4. Vizsgálni kívántuk, hogy a SCAI az EndMT, illetve iPS-reprogramálás során jelezheti-e az endothel/epithel fenotípust.

A metasztatikus extravasatio során az endothelsejtekben számos változás jön létre. E változások egy EndMT-hez hasonlóak, ezért egy hipotézist állítottunk fel, ami szerint szorosan kapcsolódó endothelsejteket tartalmazó erekben – a tüdőben vagy az agyban – metasztatikus extravasatio során egy EndMT jön létre. E hipotézist vizsgáló modellünkben arra kerestük a választ, hogy a metastasisképzés során az extravasatióban szerepet játszhat-e ez a folyamat. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy:

1. *In vitro* agyi endothelsejteken TGF- $\beta$ 1-hatásra EndMT játszódik-e le.
2. Tumoros sejtek képesek-e TGF-dependens módon EndMT-t indukálni agyi endothelsejtekben.

### **3. Módszerek**

#### **3.1 Sejtkultúra**

A CL4 klónszámú, nyúl angiotensin II 1-es típusú receptort stabilan expresszáló sertés proximalis tubulus epithelsejtek (LLC-PK1) dr. R. Harris ajándéka volt.

Az GFP-SCAI- t stabilan expresszáló sejteket FuGene6 (Roche, Mannheim, Németország) transzfekciót követően Aria High Speed Cell Sorter (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) válogattuk szét, FACSCalibur flow cytometer és CellQuest szoftver (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) segítségével igazoltuk, hogy a sejtpopuláció szinte teljes egészében GFP pozitív.

A primer patkány agyi endothelsejteket (RBEC) kéthetes Wistar patkányokból (Toxi-Coop, Budapest, Magyarország) izoláltuk. Ez a hazai és nemzetközi ajánlásoknak megfelelően történt. Az erre vonatkozó protokollt a Csongrád megyei Regionális Állategészségügyi és Élelmiszervizsgálati Felügyelet felülvizsgálta és engedélyezte (engedélyszám: XVI/2980/2012).

Az emberi köldökzsinór-vénából származó endothelsejteket (HUVEC) a korábbi kísérleteinknek megfelelő módon izoláltuk. A mintákat a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikától kaptuk. A beleegyező nyilatkozatot és a mintakezelést a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (Budapest, Magyarország) hagyta jóvá (TUKÉB 126/2014).

A B16/F10, rágcső-melanomasejteket RPMI-ben tenyésztettük.

Az A2058 humán melanomasejteket MEM médiumban tenyésztettük.

Az SK-BR3, MCF-7 és MDA-MB231 humán emlőtumorsejteket DMEM-ben tenyésztettük.

A humán iPS-sejtek reprogramálását a korábbiakban leírtaknak megfelelően végeztük.

#### **3.2 Tranziens transzfekció, luciferáz promoteraktivitás assay**

Az LLC-PK1 sejteket 6 csészes sejttenyésztő tálcán növesztettük, és közel konfluens állapotban FuGene 6 reagens (Roche, Mannheim, Németország) használatával transzfektáltuk 1 µg DNS / 2.5 µL reagens arányban. A promoteraktivitás meghatározásához 0.5 µg promoter konstruktot, 0.05 µg pRL-TK-t és 2 µg üres vektort (pcDNA3.1), vagy a vizsgált konstruktot kotranszfektáltuk. A szentjánosbogár- és Renilla luciferáz (belső kontroll)-aktivitást Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) segítségével határoztuk meg, a gyártó protokolljának megfelelően. A mérésekhez Victor X3 2030 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) luminométert használtunk

### **3.3 Unilateralis ureter obstructios (UO) egérmodell**

Az ureter obstructios kísérleteket C57BL/6 hím egereken dr. Hamar Péter csoportja végezte a Semmelweis Egyetem Kórélettani Intézetében. Az állatokat a Charles Rivertől (Munich, Németország) rendelték, és a Semmelweis Egyetem állatházában tenyésztették. Tartásuk során szokványos rágcsálótáplálékot kaptak és vizet pedig ad libitum. Minden állatkísérlet a Semmelweis Egyetem szabályainak és a jogszabályi előírásoknak (1198/XXVIII tv. Az állatok védelméről és kíméletéről, 243/1998(XII.31) Kormányrendelet az állatkísérletek végzéséről) megfelelően történt.

### **3.4 Vesetranszplantáció rejekciós modell**

A vesetranszplantációs kísérleteket Dr. Hamar Péter csoportja végezte a Semmelweis Egyetem Kórélettani Intézetében.

A hím Lewis (LEW, RT1<sup>l</sup>) és hím Brown-Norway (BN, RT1<sup>n</sup>) patkányokat a Charles Rivertől (Munich, Németország) szerezték be az Akronom Kft.-n (Budapest, Magyarország) keresztül. A patkányok keresztezésével Lew-is-Brown-Norway (LEW x BN F1, LBN) hibrid állatokat tenyésztettek a Semmelweis Egyetem állatházában. A hibrid állatok tartása során szokványos rágcsálótáplálékot kaptak és vizet pedig ad libitum. Minden kísérleti eljárást a hatályos magyar jogszabályoknak, valamint az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet laboratóriumi állatok tartásáról és felhasználásáról szóló irányelveinek megfelelően végeztek. A kísérleti protokollt a Semmelweis Egyetem Etikai Tanácsa (Budapest, Magyarország) a laboratóriumi állatok tartásáról és felhasználásáról szóló törvényi előírások alapján hagyta jóvá (XIV-I-001/2012-4/2012).

### **3.5 Kvantitatív real-time PCR vizsgálat**

A vizsgálatokhoz a HUVEC-, illetve iPS-sejteket PBS-szel egyszer mostuk, majd – a gyártó előírásainak megfelelően – az RNS-t TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével izoláltuk. 2 µg RNS került reverz transzkripcióra (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), random primerekkel. A PCR-reakciókat BioRad CFX thermalcyclerrel (BioRad, Hercules, CA, USA) végeztük, amihez Maxima SYBR Green PCR Master Mixet (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk, 95 °C-on 15 másodperces, 60°C-on 60 másodperces időtartamokat alkalmaztunk 40 cikluson keresztül. A reakció specificitását és hatékonyságát olvadási és standardgörbe-analízissel igazoltuk. Az átlagértékeket a 2- $\Delta\Delta C_t$  segítségével írtuk le. Minden kísérletet párhuzamosan három mintával végeztünk, és minden kísérletet két alkalommal ismételtünk meg.

### **3.6. Western blot**

A sejteket jéghideg PBS-szel mostuk, majd lízis felkapartuk. A sejtlyázátum fehérjekoncentrációját BCA Protein Assayvel (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), ezt követően az abszorbanciát Beckton Dickinson spektrofotométerrel 562 nm-en határoztuk meg. Az egyes abszorbanciaértékekhez tartozó fehérjekoncentrációt marhaszérum-albumin hígítási sorral készített standard görbe alapján állapítottuk meg.

A sejtlyázátumot ezután 1:1 arányban kétszeres koncentrációjú Laemmli-pufferral (375 mM TRIS (pH 6,8), 10% SDS, 20% glicerin, 0,005% brómfenilkék és 2%  $\beta$ -merkaptoetanol) összekevertük, majd 5 percig 100 °C-on forraltuk.

A mintákat Mini Protean II és III apparátussal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 10-12%-os redukáló SDS-poliakrilamid géleken szeparáltuk. A fehérjéket szeparálódás után Towbin-féle transzfer pufferben (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,3) 350 mA áramerősséggel, 90 percig nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) transzferáltuk. Blokkolást és mosást követően a membránokat hűtőgépben +4 °C-on egy éjszakán át elsődleges antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. Az antitesteket 0,5% albumint tartalmazó TBS oldatban hígítottuk (általában 1:1000 hígítást használtunk). A megfelelő torma-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk újabb 90 percig. A peroxidáz-pozitív csíkokat elektrolumineszcens érzékelő rendszerrel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) jelenítettük meg.

### **3.7 Microarray alapú génexpressziós-analízis**

A génexpressziós profilokat a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisából használtuk, ami a National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) részét képezi. Az adatok a HUVEC-sejtek, illetve HUVEC és 1205LU melanoma sejtek ko-kultúrák vizsgálataiból származnak (elérési szám: GSE8699). A génexpressziós szintek különbségét kizárólag HUVEC valamint a HUVEC és 1205LU melanoma sejt ko-kultúrája között vizsgáltuk. A két adatcsoport vizsgálatakor azokat a géneket figyelembe véve, melyek detektálási p értéke kisebb, mint 0.05 volt, és expressziós szintjük legalább másfélszeres változást mutatott.

### **3.8 Statisztikai elemzés**

A transzfekciós kísérletek során minden mérést duplikátumban végeztünk, és legalább három alkalommal ismételtünk. Az eredmények feltüntetésekor az átlagot és a standard deviációt jelöltük. A kezelt és kezeletlen csoportok luciferáz aktivitását (relatív promoteraktivitást) hasonlítottuk össze.

A kvantitatív RT-PCR vizsgálatainkban biológiai triplikátumokat használtunk, az eredmények elemzéséhez Mann-Whitney U tesztet használtunk.

Western blot vizsgálatainkat legalább három alkalommal ismételtünk, az eredményeket egy-egy reprezentatív képpel mutatom be.



## **4. Eredmények**

### **4.1 A SCAI-fehérje szerepe proximalis tubulus sejtek epithelialis mesenchymalis transitiójában**

#### **4.1.1 A SCAI gátolja a TGF- $\beta$ 1 kiváltotta SMA-, calponin- és CTGF fehérjeexpressziót.**

LLC-PK1 sejtekben a TGF- $\beta$ 1-kezelés nagyfokú SMA-expressziót eredményezett, míg a SCAI-t tartósan expresszáló sejtekben SMA-expresszió alig volt észlelhető. A SCAI-t stabilan expresszáló LLC-PK1 sejtekben (LLC-PK1/GFP-SCAI) háromnapos TGF- $\beta$ 1-kezelést követően a calponinexpresszió kisebb volt a kontroll LLC-PK-sejtek calponinexpressziójához hasonlítva. Ezzel párhuzamosan a SCAI gátolta az E-cadherin-expresszió csökkenését. A TGF- $\beta$ 1-kezelés hatására CTGF- expresszió következett be, ami az LLC-PK/SCAI-sejtekben kisebb mértékű volt.

#### **4.1.2 A SCAI-fehérje gátolja az MRTF-A és MRTF-B okozta SMA-promoter-aktivitás növekedését.**

Az ezt követő kísérletekkel a SCAI és az MRTF SMA-promoterre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az MRTF-A és MRTF-B az SMA-promoter ismert aktivátora, azonban SCAI-t tartósan expresszáló sejtekben a kifejezett SMA-promoteraktiváció nem jelentkezett.

#### **4.1.3 A SCAI gátolja az SMA-promoter RhoA, Rac1, Cdc42 indukált aktivációját.**

Az SMA-promotert az MRTF-SRF-útvonalon keresztül az ún. kis GTPáz molekulák is szabályozzák. A RhoA, Rac1, Cdc42 konstitutívan aktív formájú fehérjét stabilan expresszáló plazmidok transzfekciója LLC-PK1 sejtekben SMA-promoteraktivitás-növekedést hozott létre. Ezt a hatást a SCAI-expresszió csökkentette.

#### **4.1.4 A SCAI CARG-függő módon gátolja a TGF- $\beta$ 1, MRTF-A és MRTF-B kiváltotta SMA-promoteraktivitást.**

Annak vizsgálatára, hogy a SCAI az MRTF CARG domainen való hatását gátolja-e, további kísérleteket végeztünk. Ezekhez olyan 153 bázispár hosszúságú SMA- promotert használtunk, melyen megtalálható a két CARG elem és a TCE elem, azonban az SBE-k és az E-box hiányzik. A SCAI és a 152 bp hosszúságú SMA-promoter kotranszfekcióját követően a TGF- $\beta$ 1-kezelés a kontrollcsoporthoz viszonyítva kisebb SMA-promoteraktivitás-növekedést okozott. Ugyanez a hatás MRTF-A kotranszfekcióját követően is megfigyelhető volt, a SCAI 60%-kal csökkentette az MRTF-A kiváltotta SMA-promoteraktivitás-növekedést MRTF-B

kotranszfekciója esetén a SCAI 53%-kal csökkentette az MRTF-B kiváltotta SMA-promoteraktivitás-növekedést.

#### **4.1.5 TGF- $\beta$ 1-kezelés hatására változik a SCAI-, MRTF-expresszió LLC-PK1 sejtekben.**

LLC-PK-sejtek háromnapos TGF- $\beta$ 1 kezelését követően Western blot vizsgálatot végeztünk a SCAI fehérjeexpresszió vizsgálatára. Eredményeink alapján a TGF- $\beta$ 1 csökkentette a SCAI kifejeződését az LLC-PK1 sejtekben. Az MRTF expressziót vizsgálva háromnapos TGF- $\beta$ 1 kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy az MRTF-A és MRTF-B expresszió is kifejezettebbé vált.

#### **4.1.6 UUO modellben a SCAI fehérjeexpressziója csökken.**

Vizsgálatunkat *in vivo* kísérletekkel egészítettük ki, egér UUO-modellből származó vesemintákat Western blottal vizsgáltunk. Az obstruált vesékből származó mintákban a SCAI-koncentráció csökkent, az SMA-expresszió a kontrollminták értékeihez viszonyítva nőtt.

#### **4.1.7 Allograft rejekeációs modellben megváltozik az SMA- és SCAI fehérjeexpresszió.**

Az UUO-t követően egy klinikailag is fontos betegséget, a vesetranszplantációt követő allograft nephropathiát vizsgáltuk patkánymodellben. Mintáinkat a 4. és a 7. poszttranszplantációs napon vizsgáltuk, a korai fibrotikus események megismeréséhez kontrollként a donorok ép veséjét használtuk. Az SMA fehérjeexpresszió emelkedése mellett a SCAI-fehérje kifejeződésének drasztikus csökkenése volt megfigyelhető.

#### **4.1.8 A SCAI gátolja az angiotensin II kiváltott SMA promoteraktivációt LLC-PK1 sejtekben.**

SMA promotert tartalmazó luciferáz riporter konstruktot transzfektálva angiotensin II-vel kezeltük az LLC-PK1 sejteket, ami a promoter kifejeződését növelte. Ezt a hatást a candesartan gátolta. A MyoC domináns negatív formájának kotranszfekciójával vizsgálni tudtuk az MRTF-ek szerepét az angiotensin II kiváltotta SMA-promoteraktivációban. A DNMyoC-vel kotranszfektált sejtekben az angiotensin II hatás kevésbé markánsan jelent meg. Emellett az MRTF-ek specifikus gátlószerével, a CCG-1423-mal történő előkezelés is ugyanezt eredményezte. Végül – az angiotensin II hatás MRTF közvetítettségének igazolása után – az SMA-t SCAI-jal kotranszfektáltuk. A SCAI gátolta az angiotensin II kiváltotta SMA-promoteraktivációt.

#### **4.1.9 A SCAI mRNS-expressziója csökkent EndMT, iPS modellben.**

HUVEC-sejtek tumorsejt aktivált kondicionált médiumával (ACM) történő kezelését követően vizsgáltuk a SCAI mRNS mennyiségét, ami 48 órás kezelést követően szignifikánsan csökkent.

Fibroblastok iPS reprogramálásakor vizsgáltuk a sejtek expressziós mintázatát, lévén a folyamat hasonlóságot mutat(hat) a mesenchymalis epithelialis transitióhoz. Először megvizsgáltuk a fibroblastokban és az iPS sejtekben a Nanog, egy őssejtekre jellemző marker mRNS-expresszióját, ami az érett sejtekben nem jelent meg. Ugyanez a dinamika az E-cadherin tekintetében is igazolódott. Végül a SCAI-expressziót vizsgáltuk az újraprogramozott sejtekben, ami a fibroblastok csekély mértékű expressziójához képest jelentősen megnőtt.

## **4.2 A primer patkány agyi endothel sejtek EndMT-jének vizsgálata**

### **4.2.1 A TGF- $\beta$ 1-kezelés primer BEC sejtekben EndMT-t hoz létre.**

Következő kísérletsorozatunkban az agyi endothelsejtek EndMT-jét vizsgáltuk. Primer patkány agyi endothelsejteket TGF- $\beta$ 1-kezelésnek vetettünk alá. A hatására a claudin-5, az occludin és a VE-cadherin fehérjeexpressziója csökkent, míg a  $\beta$ 1-integrin-, fibronectin-, N-cadherin-expresszió nőtt.

### **4.2.2 A TGF- $\beta$ 1 kiváltotta SMA-expresszió TGF $\beta$ -receptorhoz és ROCK-hoz kötött BEC sejtekben.**

Annak igazolására, hogy a hatás TGF- $\beta$ 1-hoz köthető, a sejteken SB-431542-t alkalmaztunk, ami a TGF- $\beta$  receptor 1 kináz ismert inhibitora. A gátlószerezrel előkezelt sejtekben TGF- $\beta$ 1-hatásra a kifejezett SMA-, illetve calponin-expresszió-növekedés nem jött létre. A Rho-SRF útvonal érintettségének igazolására egy specifikus Rho kináz inhibitor (Y-27632) alkalmaztunk. A gátlószerez gátolta a TGF- $\beta$ 1 által kiváltott SMA-expressziót.

### **4.2.3 B16/F10 melanoma sejtek aktivált-kondicionált médiuma (ACM) RBE-sejtekben TGF- $\beta$ -jelátvitellel EndMT-t hoz létre.**

Az ACM a TGF- $\beta$ 1-hez hasonlóan csökkentette a claudin 5 fehérjeexpresszióját RBE sejtekben, ezt a hatást a kondicionált médium (CM) nem váltotta ki. A fibronectin és az SMA fehérje kifejeződését a TGF- $\beta$ 1 és az ACM növelte, míg a CM nem okozott ilyen választ RBE sejtekben. A foszforilált Smad2-, Smad3-expresszió ACM kezelést követően nőtt. Ezután a specifikus TGF- $\beta$ 1-hatás igazolására inhibitoros kísérleteket végeztünk, az SB-431542

kezelés gátolta a claudin-5-expresszió kifejezett csökkenését ACM-hatás mellett. Emellett a gátlószeres kezelés megakadályozta az ACM kezelést hatására létrejövő fibronectin-, SMA-fehérjeexpresszió-növekedést RBE sejtekben.

#### **4.2.4 Többféle tumorsejt aktivált-kondicionált médiuma is – TGF- $\beta$ jelátvitel útján – SMA-expressziót okoz RBE sejtekben.**

Aktivált kondicionált médiumot (ACM) hoztunk létre a fent leírtaknak megfelelően A2058 humán melanoma sejtekkel, MCF-7 humán emlő adenocarcinoma sejtekkel, MDA-MB231 humán emlő adenocarcinoma sejtekkel is. Az RBE sejtek ezekkel történő kezelése mindhárom esetben SMA-expressziót hozott létre, amit az SB-431542 előkezelés mindhárom esetben gátolt.

#### **4.2.5 Az aktivált-kondicionált médium TGF- $\beta$ jelátvitel útján SMA-expressziót hoz létre HUVEC-sejtekben.**

HUVEC-sejteken is megvizsgáltuk az MDA-MB231 és SK-BR3 hatását, annak igazolására, hogy az emlőtumoros sejtek más endothelsejteken is elérik a fenti hatásokat. Az MDA-MB231 ACM SMA-expressziót hozott létre, csakúgy mint az SK-BR3 ACM. Ezeket a hatásokat az SB-431542 gátlószer ebben az esetben is gátolta, jelezvén, hogy az ACM SMA-fehérjeexpressziót növelő hatása TGF- $\beta$  függő.

A Gene Expression Omnibus (GEO) publikus adatbázisában fellelhető adatok alapján HUVEC és 10205 Lu humán metasztatikus melanomasejtek ko-kultúrája során a HUVEC-sejtek mRNS mintázata a következőképpen változott: több endothel marker (KRT7, KRT18, TJP2) expressziója csökkent az FST-vel együtt, ami EMT/EndMT antagonist. Ugyanakkor az EndMT markerek (FN1, COL3A1, S100A4, MMP2, COL1A2) és transzkripció regulátorok (ZEB1, Wnt5a, TWIST1, Snai2) expressziója megnő. Ezek együttesen jelezhetik, hogy melanoma sejtek jelenlétében EndMT-re jellemző változások mennek végbe a HUVEC-sejtekben.

## 5. Következtetések

Munkánk célkitűzéseit két fő témakörben határoztuk meg, ennek megfelelően következtetéseinket is ezek alapján ismertetem:

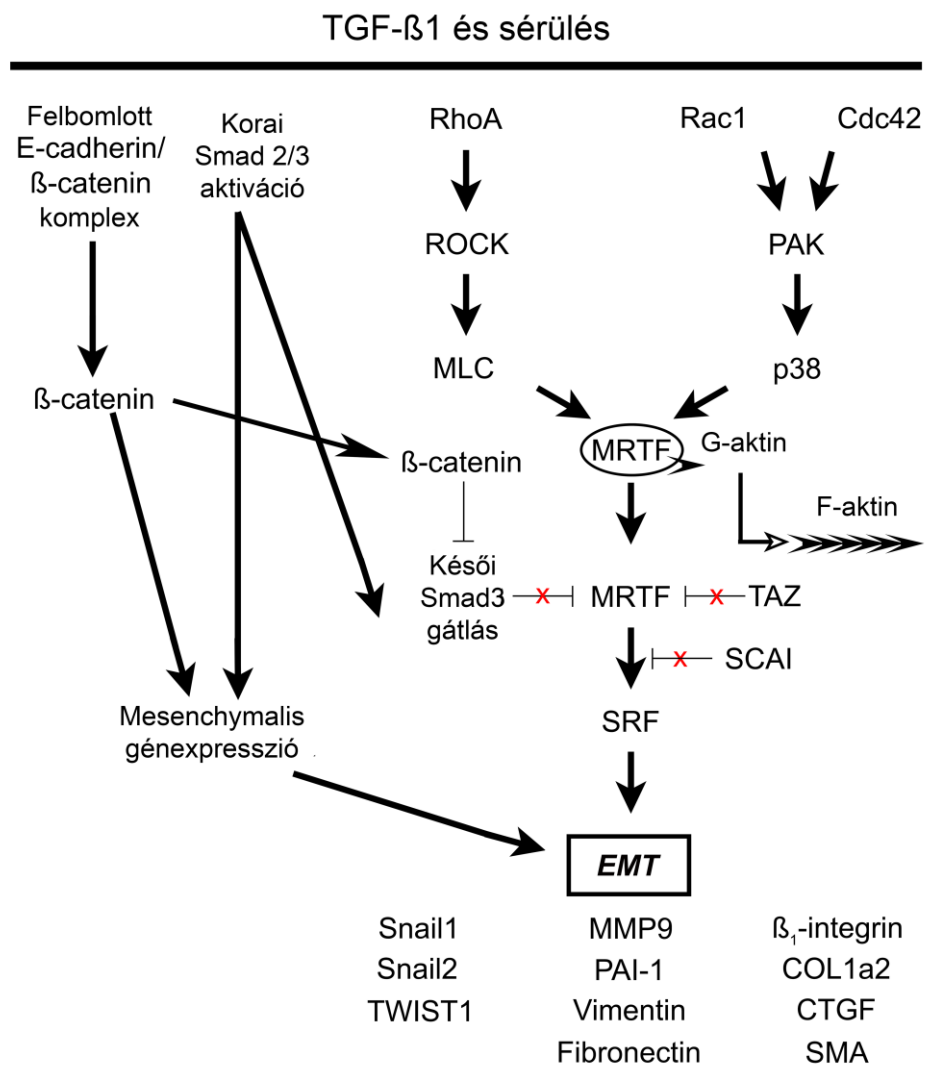
### A SCAI szerepe EMT-ben és vesefibrosisban

1. A SCAI fehérje gátolta a TGF- $\beta$ 1 kezelés okozta SMA-promoteraktivációt LLCPK1 sejteken. A SCAI-t tartóan expresszáló sejtekben a TGF- $\beta$ 1 okozta SMA, calponin és CTGF fehérjeexpresszió-növekedés kisebb volt a kontroll sejtekhez képest, a TGF- $\beta$ 1 okozta E-cadherin fehérjeexpresszió-csökkenés pedig mérsékeltebb volt a kontrollsejtekhez képest. A SCAI tehát több TGF- $\beta$ 1 közvetített hatást is gátol epithelsejteken (1. ábra). LLC-PK1 sejteken SMA-promoter-transzfekciót követő angiotensin-II kezelés SMA-promoterexpresszió-növekedését hozott létre, ezt a hatást a candesartan gátolta. A domináns negatív MyoC-kotranszfekció vagy az MRTF-specifikus gátlószer CCG1423-előkezelés csökkentette az SMA-promoteraktivitás-növekedést. A SCAI kotranszfekciója szintén csökkentette az SMA-promoteraktivitás-növekedést. Az MRTF az angiotensin II függő SMA-promoteraktivitást is közvetíti, mely hatást a SCAI gátolja.

2. A SCAI-t tartóan expresszáló sejtekben az SMA és az MRTF-A, illetve MRTF-B kotranszfekciója során az MRTF-ek SMA-ra gyakorolt promoteraktiváló hatása csökkent volt. A kis GTPáz-molekulák (Rho, Rac, Cdc42) mindegyike SMA-promoteraktivitás-növekedést hoz létre, ezt a hatást a SCAI jelenléte csökkentette. Egy 152 bázispár hosszúságú, csak két CarG- és a TCE-elemet tartalmazó SMA-promoter és a SCAI kotranszfekciója esetén a TGF- $\beta$ 1-kezelés, az MRTF-A vagy MRTF-B kotranszfekció csökkent mértékű SMA-promoteraktivitás-növekedést okozott, igazolván, hogy ezt a hatást a SCAI CARG specifikusan gátolja. A SCAI az SMA-promotert az MRTF kofaktoraként szabályozza.

3. LLC-PK1 sejtek háromnapos TGF- $\beta$ 1 kezelése esetén a SCAI-fehérjeexpressziója csökkent, C57BL/6 egereken végzett UUO kísérlet során az obstruált vesékben a SCAI-fehérjeexpressziója csökkent, az SMA-fehérjeexpresszió nőtt. LBNF1-LEW patkányokban végzett allograft-rejekciós modelljében az allograftokban a donorok ép veséjéhez képest az SMA-fehérjeexpresszió a transzplantációt követő 4. és 7. nap után fokozatosan nőtt, míg a SCAI-fehérjeexpresszió meredeken csökkent.

4. HUVEC-sejtek EndMT modelljében, a tumorsejtvonallal aktivált-kondicionált médium hatására a SCAI mRNS expresszió csökkent a kontrollhoz hasonlítva. Fibroblastok iPS-reprogramálásakor a Nanog, E-cadherin és SCAI-expresszió megnőtt. Mindezek alapján a SCAI-expresszió inkább az endothel és epithel fenotípusra jellemző, mesenchymalis jellegű sejtekben expressziója csökken.



1. ábra A SCAI fehérje szerepe az EMT folyamatában.

## **Az EndMT és a metastasisképződés kapcsolata**

1. Primer patkány agyi endothelsejtekben TGF- $\beta$ 1-hatásra a claudin-5, occludin, VE-cadherin fehérjeexpresszió csökkent, a  $\beta$ 1-integrin, N-cadherin-expresszió nőtt. Gátlószeres kísérletekkel igazoltuk, hogy a hatás TGF- $\beta$ -receptorhoz és ROCK-hoz kötött.

2. A TGF- $\beta$ -kezeléshez hasonlóan RBE sejteken melanomasejtek aktivált-kondicionált médiuma csökkentette a claudin-5 expressziót, és növelte a fibronectin és SMA-expressziót. A pSmad-2,3- expresszió a kontrollhoz képest nőtt, alátámasztva, hogy a hatás TGF- $\beta$  által közvetített az endothelsejtekben. A hőaktiválás nélküli kondicionált médiumok nem hozták létre a TGF- $\beta$  kezelésre jellemző hatásokat. Gátlószeres kísérletekkel szintén alátámasztható volt a TGF- $\beta$ 1-út vonal szerepe az ACM okozta claudin-5, fibronectin, SMA expresszió változásban.

Többféle tumorsejt (melanoma, emlőtumor) aktivált-kondicionált médiumával is vizsgálatokat végeztünk, melyek ACM-e SMA-expressziót hoztak létre RBE sejtekben, és VE-cadherin downregulációt okoztak, mely hatásokat a TGF- $\beta$ 1 specifikus gátlószer szignifikánsan csökkentette. Ezek alapján megállapítható, hogy többféle daganatsejt aktivált-kondicionált médiuma is TGF- $\beta$ -szignalizáció útján okozott EndMT jellegű változást RBE-sejteken.

Az RBE sejtek mellett egyéb endothelsejten (HUVEC) is vizsgáltuk a tumoros sejtek ACM-jének hatását, ami növelte az SMA-fehérjeexpressziót, s amely hatást a TGF- $\beta$ 1-specifikus gátlószer ebben az esetben is szignifikánsan csökkentette. Génexpressziós adatbázisban vizsgálva a HUVEC-sejtek és 1205Lu humán metasztatikus melanomasejtek ko-kultúrája EndMT-re jellemző változásokat hozott létre a HUVEC-sejteken.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Fintha A, Gasparics Á, Fang L, Erdei Z, Hamar P, Mózes MM, Kökény G, Rosivall L, Sebe A. (2013) Characterization and role of SCAI during renal fibrosis and epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol.* 182(2):388-400. IF: 4,602
2. Krizbai IA, Gasparics A, Nagyőszai P, Fazakas C, Molnár J, Wilhelm I, Bencs R, Rosivall L, Sebe A. (2015) Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation. *PLoS One.* 10(3):e0119655. IF: 3,057
3. Gasparics A, Rosivall L, Krizbai IA, Sebe A. (2016) When the endothelium scores an own goal: endothelial cells actively augment metastatic extravasation through endothelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1; 310(9):H1055-63. IF: 3,348
4. Gasparics, Á. and Sebe, A. (2018), MRTFs- master regulators of EMT. *Dev. Dyn.*, 247(3):396-404. IF: 2,507
5. Gasparics Á, Kökény G, Fintha A, Bencs R, Mózes MM, Ágoston EI, Buday A, Ivics Z, Hamar P, Győrffy B, Rosivall L, Sebe A. (2018) Alterations in SCAI Expression during Cell Plasticity, Fibrosis and Cancer. *Pathol Oncol Res.* 24(3):641-651. IF: 1,935

### 6.2. A disszertációtól független közlemények

1. Varga P, Berecz B, Gasparics Á, Dombi Z, Varga Z, Jeager J, Magyar Z, Rigó J Jr, Joó JG, Kornya L. (2017) Morbidity and mortality trends in very-very low birth weight premature infants in light of recent changes in obstetric care. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 211:134-139. IF: 1,809
2. Varga P, Berecz B, Pete B, Kollár T, Magyar Z, Jeager J, Görbe ÉR, Rigó J, Joó JG, Gasparics Á.. (2018) Trends in Mortality and Morbidity in Infants Under 500 Grams Birthweight: Observations from Our Neonatal Intensive Care Unit (NICU) *Med Sci Monit.* 24:4474-4480. IF: 1,894