

A syndecan-1 és -2 szerepe a HT-1080 fibroszarkóma sejtek biológiai viselkedésében

Doktori tézisek

Péterfia Bálint

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila, laboratóriumi szakorvos
Dr. Deák Ferenc, tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bán Zoltán, egyetemi tanársegéd
Dr. Réz Gábor egyetemi docens

Budapest
2012

BEVEZETÉS

A syndecanok a leggyakoribb sejtfelszíni proteoglikánok. Variábilis ektodoménjukhoz glikózaminoglikán (GAG) cukorláncok kapcsolódnak, amelyek révén az extracelluláris mátrix (ECM) számos komponensét képesek megkötni. Az ektodomének levágódása, azaz shedding-je révén a hozzá kötött GAG-ok és ECM fehérjék a sejtfelszíntől eltávolodnak és a szövetközi folyadékba, illetve testnedvekbe oldódva egyéb biológiai funkciókat is betölthetnek. A sejtmembránban visszamaradó csonka vázfehérje sorsa, illetve funkciója még nincsen tisztázva.

A syndecanok jellegzetes, szövetspecifikus expressziója, illetve expressziós mintázatuk az embrionális fejlődés során alakul ki. Felnőttkorban a syndecan-1 többnyire hámsejteken fordul elő, igaz a fogak, a tüdők, illetve a végtagok fejlődése során az aggregálódó mesenchyma sejteken is megjelenik.

Az egyes syndecanok expressziója, illetve a syndecanok expressziós mintázata a tumorok kialakulása és fejlődése során megváltozhat. Több tumorféleségnél is a syndecan-1 vagy -2 expressziója a differenciáltsággal és stádiummal korrelál. Noha a syndecanok – és különösen a syndecan-1 – szerepével sok tanulmány foglalkozott már

karcinómákon, mesenchyma eredetű tumorok esetében kevés az erre vonatkozó adat.

A syndecan-1 számos mesenchyma eredetű tumorban kimutatható a sejtfelszínen, sőt, bizonyos esetekben a citoplazmában is. Mesotheliomákban a ritkán kifejeződő syndecan-1 jelenléte az epitheliálisabb morfológiával és a hosszabb túléléssel társul. Sejttenyészetben a malignus mesothelióma sejtek kevesebb syndecan-1-et termelnek, mint a benignusak, függetlenül a differenciáltsági fokuktól.

Oszteoszarkóma sejteken a syndecan-2 expressziója alacsonyabb, mint a normális csontok oszteoblasztjain, vagy oszteocitáin, expressziója pedig az apoptózis készségüket fokozza. A syndecan-2 túltermelése fokozza a HT-1080 sejtek migrációját mátrigél fehérjékre, ugyanezt a hatást a syndecan-1 túltermeltetésével is ki lehetett váltani.

Összességében a syndecanok az onkogenezis fontos szereplőinek tűnnek, így potenciális tumorterápiás célpontok. Ezért fontos, hogy megismerjük működésük molekuláris mechanizmusait, illetve azonosítsuk a syndecanok működésében fontos, gyógyszeres terápiával támadható elemeket.

CÉLKITŰZÉS

Munkám elsődleges célja az volt, hogy megismerjük a syndecan-1 szerepét egy mesenchyma eredetű tumoros sejtvonal biológiai viselkedésében. Ennek érdekében az alábbi vizsgálatokat kívántuk elvégezni:

1. Tanulmányozni a rekombináns syndecan-1 hatását a HT-1080 fibroszarkóma sejtvonal proliferációjában és motilitásában, az eredményeket in vivo egérmodellben is igazolva.
2. A syndecan-1 ektodoménjének, ill. sheddingjének szerepét vizsgálni a syndecan-1 működésében
3. A syndecan-1 hatásának háttérében álló jelátviteli utak vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel.
4. A syndecan-2 és a syndecan-4 túltermelés proliferációra és migrációra gyakorolt hatását vizsgálni.
5. A syndecan-1 és a syndecan-2 között feltételezhető kapcsolat kísérletes jellemzése.

MÓDSZER

A syndecanok HT-1080 fibroszarkóma sejtek viselkedésében betöltött szerepének megismeréséhez a syndecanok expressziós szintjét megváltoztattuk bennük, majd a proliferációjukat és kemotaxisukat vizsgáltuk. Az *in vivo* vizsgálatok céljából egerekbe is beoltottuk őket.

A túltermeltetéshez zöld fluoreszcens fehérjével (EGFP) fúzionáltatott, egy teljes hosszúságú és egy ektodoménjében csonkolt syndecan-1-et kódoló plazmiddal transzfektáltunk, valamint EGFP nélküli syndecan-1, -2 és -4 plazmidokkal. Kontrol sejteknek a nem transzfektált (wt) és a csak EGFP-t expresszáló sejteket használtuk. A syndecan-1 és -2 géncsendesítéséhez plazmid alapú RNS interferenciát (RNAi) alkalmaztunk, amelyhez a rekombináns mikro-RNS kódoló BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi vektor rendszert használtuk, ahol a β -D-galaktozidázt csillapító plazmid volt a kontroll. A stabil transzfektánsokat Geneticin, illetve Blaszticidin antibiotikus szelekcióval alakítottuk ki, az RNAi vektorok esetében egy további lépésben áramlási citométerrel (FACS) válogattuk ki azokat a sejteket, amelyek valóban termelték a megfelelő mikro-RNS-t és a GFP-t. A syndecan-1 / EGFP fúziós fehérjék sejten belüli eloszlását élő sejteken vizsgáltuk az MRC-1024 konfokális lézermikroszkóppal. A proliferáció vizsgálatoknál a szulforhodamin B (SRB) esszét használtuk a

sejtek mennyiségének méréséhez. A sejtek duplázódási idejét az SRB esszékkel kapott növekedési görbék log fázisából számítottuk a kirakástól számított 4. 24. és a 72. órában. A sejt migrációt egy 48 lyukú Boyden kamrában mértük, 8 µm pórusátmérőjű polikarbonát membránt és kemoattraktáns gyanánt Engelbreth-Holm-Swarm murine szarkómából származó mátrigélt használva. Az *in vivo* kísérletekhez a HT-1080 transzfektánsokat SCID egerek jobb talpába oltottuk. A primer tumorok eltávolítása után a kialakult tüdőmetasztázisok mennyiségét mértük. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz RNS-t izoláltunk a transzfektánsokból és a talptumorokból is, majd kvantitatív reverz transzkriptáz PCR-t (qRT-PCR) végeztünk saját tervezésű primerekkel, amelyek a syndecan-1 citoplazmatikus-, illetve ektodoménjére specifikusak, valamint syndecan-2-re, EGFP-re és a GAPDH-ra. Fehérje szintű vizsgálatokhoz Western blot, ELISA, FACS és immuncitokémia technikákat alkalmaztunk. A syndecan-1 hatását a HT-1080 sejtekben közvetítő jelátviteli mechanizmusok jellemzéséhez egy oligonukleotid array-t és egy foszfo receptor-tirozin kináz array-t alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

I. A syndecan-1/EGFP fúziós fehérjék expressziója és lokalizációja

A rekombináns syndecan-1/EGFP fehérjéket élő sejtekben detektáltuk, kihasználva a zöld fluorezcenciájukat. A kontroll sejtekben az EGFP a citoplazmában és a sejtmagban is jelen volt, míg a teljes hosszúságú és a csonka syndecan-1 fehérjék a sejtfelszínen és az endomembrán rendszerben helyezkedtek el. A csonka konstrukció zöld fluorezcenciájának intenzitása alacsonyabb volt, mint a teljes hosszúságúé. Anti-GFP immuncitokémiával mindkét konstrukció ugyanolyan intenzíven jelölődött a sejtmembránban.

II. A syndecan-1 transzfekeció hatása a sejtfelszíni és a szolubilis syndecan-1 mennyiségére.

A citoplazmás- és az ektodoménra specifikus primerekkel kapott qRT-PCR és immuncitokémia eredmények szerint a HT-1080 sejtek kis mértékben expresszálják a syndecan-1-et. Az EGFP-re és a citoplazmás doménra specifikus primerekkel megállapíthattuk, hogy a syndecan-1/EGFP fehérjék sikeresen expresszálódtak, megemelve ezzel az összes syndecan-1 mennyiségét a sejtekben. Sőt, a csonka konstrukció hatékonyabban expresszálódott, mint a teljes

hosszúságú válzat. Az ektodoménben csonka syndecan-1 transzfekciója után a syndecan-1 ektodomén szintjében mRNS és fehérje szinten sem találtunk eltérést a kontrol sejtekhez képest, a teljes hosszúságú syndecan-1 viszont megemelte az ektodomén mennyiségét a sejtek lizátumában és médiumában is. Ez azt igazolta, hogy a csonka syndecan-1 nem befolyásolja sem az endogén syndecan-1 expresszióját, sem pedig a sheddingjét.

III. A syndecan-1 transzfekció hatása a HT-1080 sejtek proliferációjára és migrációjára.

Mindkét syndecan-1 konstrukció serkentette a sejtproliferációt. Az oligonukleotid array-k, a Western blot és az immuncitokémiai vizsgálatok eredményei szerint azoknak a géneknek változott meg az expressziója illetve aktivációja, amelyek a sejtciklus G1/S fázis átmenetének szabályozásában vesznek részt. A CDK-2 és a Ciklin-E1 expressziója, valamint a retinoblasztóma fehérje foszforilációja fokozódott a syndecan-1 konstrukciók hatására.

A HT-1080 sejtek mátrigél fehérjék által kiváltott kemotaxisa szignifikánsan intenzívebb volt a syndecan-1/EGFP konstrukciók hatására. A csonka válzat fokozta leginkább a migrációt, szignifikánsan nagyobb mértékben, mint a teljes hosszúságú syndecan-1. A fokozott migrációval összefüggésben kimutattuk, hogy a syndecan-2 expressziója is

megemelkedik a syndecan-1/EGFP konstrukciók hatására, ezt immuncitokémiával, Western blottal és FACS-al is alátámasztottuk.

IV. A syndecan-1 hatása a HT-1080 sejtek *in vivo* malignitására

A stabil sejtvonalak egértalpra oltása utáni 24. napra a syndecan-1/EGFP transzfektánsokból szignifikánsan nagyobb primer tumorok fejlődtek, mint az EGFP kontrol sejtekből. A teljes hosszúságú konstrukció szignifikánsan nagyobb mértékben fokozta az *in vivo* proliferációt, mint a csonka változat.

A kontroll EGFP csoportban csak egy állatban alakult ki tüdőmetasztázis, az is elhanyagolhatóan kis mennyiségben. A teljes hosszúságú és a csonkolt csoportban ezzel szemben rendre 4 és 3 állatban fejlődtek ilyen áttétek. A tüdőmetasztázisok térfogataránya is szignifikánsan magasabb volt a syndecan-1 túltermelő csoportokban, mint a kontroll EGFP-ben. Ezek az adatok megerősítették a sejt kultúrában kapott kemotaxis eredményeinket.

V. A különböző syndecanok hatása a HT-1080 sejtek növekedésére és migrációjára.

Ahhoz, hogy átfogóbb képet kapjunk a syndecanok hatásáról (és hogy az EGFP fúzió befolyásoló hatását

kizárhassuk), EGFP nélküli syndecan-1 -2 és -4-et kódoló plazmidokkal transzfektáltuk a HT-1080 sejteket, majd a stabil sejtvonalak proliferációját és migrációját vizsgáltuk. Csak a syndecan-1 fokozta a sejtproliferációt szignifikánsan mind az EGFP, mind a nem transzfektált wt kontroll sejtekhez képest, ugyanakkor mindegyik syndecan paralóg több mint kétszeresére növelte a kemotaktikus motilitást.

VI. A syndecan-1 és -2 géncsendesítés hatása a proliferációra és a migrációra

Mind a syndecan-1, mind a syndecan-2 csendesítése a megfelelő syndecan expressziójának szignifikáns csökkenését okozta, míg más syndecanok expressziójában nem tapasztaltunk változást. A syndecan-2 csendesítés jelentősen gátolta a HT-1080 sejtek kemotaxisát, a proliferációját viszont csak kis mértékben. A syndecan-1 csendesítés nem befolyásolta sem a proliferációt, sem a migrációt.

VII. A csonka syndecan-1 hatását kioltja a syndecan-2 géncsendesítése

A syndecan-1 és -2 HT-1080 sejtek proliferációjában és migrációjában betöltött szerepének tisztázásához a csonka syndecan-1 konstrukciót együtt transzfektáltuk egy syndecan-2 csendesítő plazmiddal. Kontrollnak az EGFP-vel transzfektáltuk együtt a syndecan-2 csendesítő vektort, illetve

csak a β -D-galaktozidázt csillapító plazmával transzfektáltunk. A csonka syndecan-1 nem volt képes fokozni sem a proliferációt, sem pedig a kemotaxist, ha a syndecan-2 le volt gátolva, sőt, a syndecan-2 csendesítés mértékének megfelelően a migráció lecsökkent. Ezek szerint tehát a syndecan-2 hatásában dominál a syndecan-1 fölött.

VIII. A syndecan-1 és -2 kooperációjának lehetséges mechanizmusa

A syndecan-1 transzfekeció syndecan-2 indukáló hatásában kulcsfontosságú jelátviteli mechanizmusok azonosításához a kontroll EGFP, a teljes hosszúságú és a csonka syndecan-1/EGFP, valamint a syndecan-2 transzfekeciókat hasonlítottuk össze egy foszfo receptor tirozin kináz array (pRTK) segítségével, valamint Western blottal. Azokat a változásokat kerestük, amelyeket a syndecan-1 vált ki, a syndecan-2 viszont nem. A 42 vizsgált kinázból kettő foszforilációjában - az inzulin like growth factor 1 receptor (IGF1R) és Axl - találtunk eltéréseket. Közülük az Axl foszforilációja a syndecan-2 transzfekeció hatására csökkent, a syndecan-1-re nőtt, viszont az IGF1R csak a syndecan-1 transzfekeciókban volt hiperfoszforilált. Az Ets-1 expressziója is csak a syndecan-1 hatására emelkedett meg. A p44-42 és a p38 MAP kinázok a syndecan-1 és -2 transzfekeciókban is hiperfoszforiláltak voltak.

ÚJ MEGFIGYELÉSEK

Eredményeim elemzéséből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1. A syndecan-1 a HT-1080 sejtek malignitását fokozza. A molekula túltermeléskor a sejtek proliferációja és migrációs képességük is fokozódik. Ezt a hatást egy egérmodellben, *in vivo* is igazoltuk
2. A fibroszarkóma sejtvonal sejt kultúráiban a syndecan-1 a fent vázolt hatását az ektodoménje nélkül is kifejti, feltehetően a molekula vázfehérjéje a shedding által aktiválódik. Az ektodoménnek ezen felül *in vivo* további proliferáció fokozó hatása is van, ennek kiváltásában a szöveti környezet szerepe fontos lehet.
3. A syndecan-1 a ciklin-E, a CDK2, az Ets-1 transzkripció faktor és a syndecan-2 expresszióját megemeli, a retinoblasztóma fehérje és az IGF1R foszforilációját pedig fokozza.
4. A HT-1080 sejtek proliferációját csak a syndecan-1 transzfekciója fokozza, a migrációját viszont a syndecan-2 és a syndecan-4 túltermeltetése is.
5. A syndecan-1 a syndecan-2 indukcióján keresztül serkenti a migrációt, a syndecan-2 szerepe ebben a tekintetben meghatározó. A sejtproliferáció fokozásához a syndecan-1 és -2 együttes túltermelése szükséges.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A tézisek témájához szorosan kapcsolódó publikációk:

1. **Péterfia B**, Hollósi P, Szilák L, Timár F, Paku S, Jeney A, Kovalszky I. *A syndecan-1 proteoglikán hatása a HT-1080 fibroszarkóma invazivitására.* Magy Onkol. 2006;50(2):115-20.
2. **Péterfia B**, Füle T, Baghy K, Szabadkai K, Fullár A, Dobos K, Zong F, Dobra K, Hollósi P, Jeney A, Paku S, Kovalszky I. *Syndecan-1 Enhances Proliferation, Migration and Metastasis of HT-1080 Cells in Cooperation with Syndecan-2.* PLoS One. 2012;7(6):e39474. IF (2010): 4,411
3. Zong F, Fthenou E, Castro J, **Péterfia B**, Kovalszky I, Szilák L, Tzanakakis G, Dobra K. *Effect of syndecan-1 overexpression on mesenchymal tumour cell proliferation with focus on different functional domains.* Cell Prolif. 2010 Feb;43(1):29-40. IF (2010): 2,742

Egyéb publikációk:

1. Baghy K, Dezső K, László V, Fullár A, **Péterfia B**, Paku S, Nagy P, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. *Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice*. Lab Invest. 2011 Mar;91(3):439-51. IF (2009): 4,602
2. Németh A, Conesa A, Santoyo-Lopez J, Medina I, Montaner D, **Péterfia B**, Solovei I, Cremer T, Dopazo J, Längst G. *Initial genomics of the human nucleolus*. PLoS Genet. 2010 Mar 26;6(3):e1000889. IF (2010): 9,543
3. Kovalszky I, Hollósi P, Baghy K, **Péterfia B**, Füle T. *A hepatocelluláris carcinomák célzott terápiája*. Orvostudományok 2009; LXXXIV. (3):153-254.
4. Füle T, Baghy K, Tátrai P, **Péterfia B**, Kovalszky I. *A stroma szerepe a daganatok biológiai viselkedésében*. Orvostudományok, 2006;3:193-197.