

MODULÁLT ELEKTROHIPERTERMIA ÁLTAL KIVÁLTOTT SEJT HALÁL VIZSGÁLATA VASTAGBÉL EREDETŰ TUMOR MODELLLEN

Doktori tézisek

Dr. Meggyesházi Nóra

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Krenács Tibor Ph.D.

Hivatalos bírálók: , Dr. Glasz Tibor, Ph.D.
Dr. Szigeti Gyula Péter Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr Sótonyi Péter egyetemi tanár, az MTA tagja
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csurgay Árpád egyetemi tanár, az MTA tagja
Dr. Lotz Gábor, Ph.D.

Budapest
2015

1. Bevezetés

1.1. Hipertermia az onkológiában

Az onkológiai hipertermia kifejezés a tumoros szövetrel való hőközlést takarja, amelyet a konvencionális kemo- illetve sugárkezelések kiegészítésére használhatnak. A hipertermia, mint minden más onkológiai kezelés, célja a malignus szövet szelektív és teljes mértékű pusztítása. A hipertermia főbb formái közé a teljes test hipertermiát a különböző perfúziós eljárásokat és a lokális/regionális hipertermiát soroljuk. Lokális hipertermia során kisméretű daganatokat kezelnek, míg regionális hipertermia esetén a tumort tartalmazó testrészt felmelegítésére kerül sor. Lokális hő közlésre infravörös sugárzást, mikrohullámú-, rádióhullámú elektromos sugárzást vagy ultrahangot használnak.

Az onkológiai hipertermia során a hő közlésből származó energia a malignus sejtek pusztulását eredményezi. Tehát az elnyelt energia hővé alakul, amelynek következménye a hőmérsékletemelkedés. Ennek értelmében megkülönböztetendő a hő, mint elnyelt energia és a hőmérséklet változás, mint az energia elnyelés következménye. Tehát a lokális/regionális hipertermia az energia elnyelő képesség alapján veheti célba a malignus szövetet, ugyanakkor *in vivo* az energia elnyelés határfokát csökkenti a véráram, mint hűtő közeg.

1.2. Modulált elektrohipertermia alapelvei

Modulált elektrohipertermia (mEHT) egy nem invazív eljárás, amelyben az energiaközlés 1/f amplitúdó modulált 13,56 MHz rádiófrekvenciás vivő frekvenciával történik.

Biológiai anyagok bioelektrodinamikai tulajdonságait jellemezhetjük, komplex permittivitással, amely a dipolusokból származtatható, komplex vezetőképességgel, mely a szabad töltésekből adódik és a különböző frekvenciákon megjelenő eltérő relaxációkból származó diszperzív tulajdonságokkal. A fent említett jellemzők erősen frekvenciafüggők.

13,56 MHz rádiófrekvencián a tumoros szövet permittivitása és vezetőképessége jelentősen megnövekszik a malignusan el nem fajult szövethez képest, ami a tumor megváltozott metabolizmusával, a fokozott aerob glükolízissel (Warburg hatás) magyarázható. Mindez megnövekedett celluláris víz és ion tartalommal, valamint fokozott membrán permeabilitással jár.

1.3. Sejthalál formái és jellemzői

A sejthalál korai felismerhető jelei, a sejtkárosodás folyamatának visszafordíthatatlanságára utalnak. Ezt az állapotot jellemző tulajdonságok: (1) masszív kaszpáz aktiváció, amely a klasszikus apoptózisban jelenik meg, ugyanakkor ismeretes kaszpáz aktiváció nélküli

apoptózis is, sőt kaszpázok a nem apoptotikus jelátviteli folyamatokban is szerepet játszhatnak. A mitokondriális membrán potenciál elvesztése (2) a mitokondriális membrán permeabilizáció során, amikor további aktivátor fehérjék jutnak a mitokondriumból a citoplazmába (3). Végül a foszfatidilszerin (4) megjelenése a citoplazma membrán extracelluláris oldalán jellemezheti a sejthalál visszafordíthatatlan kezdetét.

A sejt akkor tekinthető halottnak, ha a citoplazma elveszti az integritását (1) vagy a membrán hólyagosodása, „blebbing” figyelhető meg a kromatin kondenzációja és a sejt fragmentációja mellett, vagy diszkrét magi testek (apoptotikus testek) jelennek meg (2), vagy *in vivo* ezen testek bekebelezése látható (3).

A programozott sejthalálnak számos formája ismeretes úgy, mint: kívülről induló „extrinsic” apoptózis, a sejten belülről közvetített „intrinsic” apoptózis (mely lehet kaszpáz küggő és kaszpáz független); nekroptózis, vagy szabályozott nekrozis; autofágiás sejthalál; mitotikus katasztrófa; netózis; parantosz; piroptózis; anoikisz; vagy entózis.

1.4. Az immunogén sejthalál jellemzői

Sokáig az apoptózist kizárólag immunológiailag inaktív sejthalálnak tartották. Manapság egy immunológiai tekintetben aktív programozott sejthalál formát is definiáltak, ez az immunogén sejthalál (ICD). ICD során masszív stressz által provokált sejthalál alakul ki, amelyet térben és időben meghatározott molekuláris mintázat (DAMP) jellemez. A DAMP szerepet játszik a tumor ellenes immunválasz kiváltásában. Ismeretes, hogy bizonyos kemoterápiás szerek (doxorubicin, oxaliplatin), szívglikozidok, vagy hipericin alapú fotodinámiás terápia kezelések képesek létrehozni ezt a jellegzetes mintázatot és az ICD-t. Megjegyzendő, hogy a különböző szerek némileg eltérő mintázatot hoznak létre.

Az ICD-re jellemző mintázat: a pre-apoptotikus ekto-kalretikulin megjelenése a citoplazma membránban, a programozott sejthalál korai fázisában; hősokk fehérjék (Hsp70 vagy 90) megjelenése a citoplazma membránban, mellyel egy időben ATP kiáramlás is lehetséges a sejtől; amit a késői fázisban a high mobility group box 1 (HMGB1) fehérje ill. Hsp sejtekből való passzív kiáramlása követ.

2. Célkitűzések

Az egyszeri mEHT kezelés által kiváltott sejtkárosodás meghatározása HT29 humán kolorektális carcinoma sejtvonalból, Balb/c (nu/nu) egerekben létrehozott xenograftokban *in vivo*.

Modulált elektrohipertermia által kiváltott sejthalál molekuláris vizsgálata a HT29 xenograft modellben.

Modulált elektrohipertermia által kiváltott további celluláris stresszhez kapcsolt molekuláris változások vizsgálata a HT29 xenograft modellben. Immunogén sejthalálra jellemző molekuláris mintázatok vizsgálata.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Tumor model és in vivo kezelés

HT29 kolorektális karcinóma sejtvonalból xenograftot hoztunk létre Balb/C (nu/nu) egerek mindlét oldali femorális régiójában, amelyek közül a jobb oldali tumort egyszeri 30 perces mEHT kezelésben részesítettük (kezelt tumor minta), míg a baloldali tumor kezeletlen maradt. A mintavételezésre a kezelést követően 0, 1, 4, 8, 14, 24, 48, 72, 120, 168, 216 órával került sor, valamint 24 és 48 órás kezeletlen kontrollokból is eltávolítottuk a daganatot.

3.2. Szövetmorfológiai analízis

Teljes keresztmetszeti tumor mintákat hematoxillinnal és eozinnal festettük, majd digitalizáltuk a Panoramic Scan berendezéssel, az analízist a Panoramic Viewer HistoQuant moduljával végeztük.

3.3. mRNS chip vizsgálat

A 4 órás kezelt, kezeletlen és a 24 órás kezeletlen kontroll fagyasztott mintákból teljes RNS-t izoláltunk, amelynek minőségét ellenőriztük. A „microarray” analízist a „Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)” ajánlása szerint végeztük. A mintákat HUG133 Plus 2.0 array-en hibridizáltuk.

3.4. Apoptózis fehérje array

Fehérjét izoláltunk a 8, 14, 24 órás kezelt és 24 órás kezeletlen kontroll mintákból. 35 apoptózis- kapcsolt fehérje expresszióját vizsgáltuk a nitrocellulóz membrán alapú „Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array Kit” array segítségével. Szemi kvantitatív kiértékeléshez ImageJ 1.45s szoftvert használtuk.

3.5. Immunperoxidáz és immunfluoreszcens vizsgálatok

Formalinban fixált, parafinba ágyazott szövetminták teljes keresztmetszeteit, vagy a belőlük készült szöveti multiblokk (TMA) metszeteit festettük: AIF (apoptosis indukáló faktor), Bax, hasított kaszpáz-3, citokróm c, mitokondriális antigén, RIP1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase), RIP3, TRAIL-R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor), Ki-67, kalretikulin, HMGB1, Hsp70, Hsp90, CD3 vagy mieloperoxidáz (MPO) antitestekkel. Az előhíváshoz vagy peroxidáz enzimmel konjugált anti-nyúl IgG-t, 3,3'-diaminobenzidin (DAB) vagy aminoetilkarbazol (AEC) kromogén mellett, vagy fluoreszcens

Alexa546-tal (narancsos-vörös) vagy Alexa488-cal (zöld) konjugált anti-nyúl IgG-t használtunk. A sejtmagokat vagy hematoxilinnal vagy DAPI-val (kék) festettük meg.

3.6. TUNEL reakció

A TMA blokkokon valamint a 24 és 48 órás kezelt és kezeletlen mintákon a DNS fragmentáció vizsgálata során terminális deoxinukleotidil transzferáz segítségével fluoreszcensen jelölt dUTP-t kapcsolunk a szabad DNS végekhez (TUNEL).

3.7. Western blott

A 8, 14 és 24 órás kezelt és kezeletlen fagyasztott mintákból fehérjét izoláltunk, majd a lizátumot poliakrilamid gélelektroforézis segítségével szétválasztottunk és PVDF membránra blottoltunk. A membránokon, peroxidázzal jelölt anti-nyúl antitesttel, kemilumineszcens jelzéssel kaszpáz-3, kaszpáz-8, RIP1 RIP3, ill. AIF fehérjét mutattunk ki.

3.8. Statisztikai vizsgálat

Egy időpont vizsgálatokor elvégzett statisztikai analízis során a normál eloszlás ellenőrzését követően t-tesztet alkalmaztunk. Az idősorozatok vizsgálatához Fridmann tesztet és Wilcoxon post-hoc tesztet alkalmaztunk. Szignifikancia határnak a $p < 0,05$ érték tekintettük.

4. Eredmények

4.1. Kezelés által kiváltott sejthalál szövetszövetmorfológiai vizsgálata

A mEHT kezelés a HT29 xenograft centrumából kiinduló szignifikáns tumor pusztulást váltott ki. A hematoxillin-eozinnal festett teljes tumor keresztmetszeteken szignifikáns pusztulást detektáltunk a 48-120 órás mintákon, ahol a maximális, hétszeres tumor elhalás a kezeletlen mintákhoz képest a 72 órás mintákon jelentkezett.

4.2. Kezelés által kiváltott DNS fragmentáció mérése

Szignifikáns DNS fragmentációt TUNEL vizsgálattal a 24 és 48 órás mintákon találtunk. Ezzel összhangban szignifikáns mennyiségű magi piknózist és apoptotikus testeket figyeltünk meg a 48 és 72 órás kezelt mintákban.

4.3. Kezelés által kiváltott mRNA expresszió vizsgálata

A Hsp70 és a Hsp 90 mRNS expresszió már 4 órával az mEHT kezelést követően szignifikáns emelkedést mutatott az ellenoldali kontrollhoz képest.

4.4. Kezelés által kiváltott fehérje expresszió vizsgálata

4.4.1. Apoptózis fehérjék vizsgálata

A Bax fehérje mitokondriumban való megjelenése és a citokróm c mitokondriumból citoplazmába történő kiáramlását 8-14 órával a kezelést követően detektáltuk. Az apoptózis indukáló faktor (AIF) magi megjelenését és az 57 kDa-os aktivált fragmentjét 14-24 órás mintákban találtuk, ami arra utalt, hogy legalább részben az AIF felelős a kromatin kondenzációért és a DNS fragmentációért. Emellett a TRAIL-R2 apoptózis receptor szignifikáns, következményes emelkedését találtunk 8 és 14 órával a kezelést követően.

Hasított/aktivált kaspáz-3-at kizárólag a tumor perifériáján, elsősorban mieloperoxidáz pozitív neutrofil granulocitákban és CD3 pozitív éretlen T-limfocitákban találtunk, míg a tumor gyakorlatilag Kaspáz-3 negatív volt. RIP1 és RIP3 fehérjék expressziójában nem találtunk különbséget a kezelt és kezeletlen tumor minták között.

A Ki67 fehérje pozitív proliferációs sejtfrakció nem mutatott különbséget a kezelt és kezeletlen minták morfológiailag intakt tumor területein.

4.4.2. Immunogén sejthalálra jellemző fehérjemintázat vizsgálata

Modulált elektrohipertermia által kiváltott sejthalállal párhuzamosan, 4 órával a kezelést követően a kalretikulin, majd 14-24 órás kezelt mintákban a Hsp70 citoplazma membránban

való megjelenését észleltük. A Hsp70 expressziójának csökkenését detektáltuk a 48 órás kezelt mintában, amelyet egy újabb szignifikáns emelkedő fázis követett 72-120 órával a kezelés után az épen maradt kezelt tumor területeken. A Hsp90 sejt membránban való megjelenését csak a késői 168-216 órás kezelt mintákban tapasztaltunk. A Hsp70 kinetikájával ellentétben a Hsp90 expressziója 24-216 óráig emelkedett szintet mutatott. A HMGB1 fehérje magból a citoplazmába való kiáramlását 24 órával a kezelést követően figyeltük meg, mely fehérje 48 órával a kezelés után teljes mértékben eltűnt az elpusztult sejtekből.

4.4.3. **Immunsejtek azonosítása**

A mieloperoxidáz pozitív neutrofil granulocita és monocita sejtek száma szignifikánsan nagyobb volt 48, 72, 120, 168, 216 órával a kezelést követően a kezelt mintákban. A CD3 pozitív éretlen T limfociták száma szignifikáns emelkedést mutatott a kezelt tumorokban 120, 168 és 216 órával a kezelés után.

5. Következtetések és egyedi megfigyelések

Meghatároztuk az egyszeri mEHT kezelés által kiváltott sejtkárosodás idő függését HT29 humán kolorektális carcinoma sejtvonalból létrehozott xenograftokban.

Modulált elektrohipertermia által kiváltott sejthalál kaspáz független úton zajlik a HT29 xenograft modellben.

Az egyszeri mEHT kezelés hatására az immunogén sejthalálra jellemző molekuláris DAMP mintázat tér-időben való megjelenését találtuk úgy, mint a kalretikulin, Hsp70 és Hsp 90 sejtmembránban való megjelenését és a HMGB1 magi kiáramlását a HT29 kolorektális karcinóma xenograftban egyéb terápiás kezelések alkalmazása nélkül.

Eredményeink arra utalnak, hogy a mEHT immunogén sejthalált (ICD) válthat ki, a szisztémás immunfunkciók negatív befolyásolása nélkül.

6. Saját publikációk jegyzéke

Publikációk a PhD tézis témájában

1. Andocs, G., Meggyeshazi, N., Balogh, L., Spisak, S., Maros, M. E., Balla, P., Kiszner, G., Teleki, I., Kovago, C. and Krenacs, T. (2014). "Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia." *Cell Stress Chaperones*. [Epub ahead of print]
Andocs G. és Meggyeshazi N. megosztott első szerzők.
2. Meggyeshazi, N., Andocs, G., Balogh, L., Balla, P., Kiszner, G., Teleki, I., Jeney, A. and Krenacs, T. (2014). "DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia." *Strahlenther Onkol.* 2014, 190:815-22.

Publikációk a PhD tézis témáján kívül

1. Teleki, I., Szasz, A. M., Maros, M. E., Gyorffy, B., Kulka, J., Meggyeshazi, N., Kiszner, G., Balla, P., Samu, A. and Krenacs, T. (2014). "Correlations of differentially expressed gap junction connexins cx26, cx30, cx32, cx43 and cx46 with breast cancer progression and prognosis." *PLoS One* **9**(11): e112541.
2. Penzvalto, Z., Lanczky, A., Lenart, J., Meggyeshazi, N., Krenacs, T., Szoboszlai, N., Denkert, C., Pete, I. and Gyorffy, B. (2014). "MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer." *BMC Cancer* **14**: 837.
3. Paszti-Gere E, Barna RF, Kovago C, Szauder I, Ujhelyi G, Jakab C, Meggyesházi N, Szekacs A. "Changes in the Distribution of Type II Transmembrane Serine Protease, TMPRSS2 and in Paracellular Permeability in IPEC-J2 Cells Exposed to Oxidative Stress." *Inflammation*. 2014 Aug 6. [Epub ahead of print]
4. Kiszner, G., Wichmann, B., Nemeth, I. B., Varga, E., Meggyeshazi, N., Teleki, I., Balla, P., Maros, M. E., Penksza, K. and Krenacs, T. (2014). "Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas." *Virchows Arch* **464**(5): 603-612.

5. Stelkovic, E., Kiszner, G., Meggyeshazi, N., Korom, I., Varga, E., Nemeth, I., Molnar, J., Marczinovits, I. and Krenacs, T. (2013). "Selective in situ protein expression profiles correlate with distinct phenotypes of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin." *Histol Histopathol* **28**(7): 941-954.

Idézhető absztraktok:

1. Meggyeshazi, N; Andocs, G; Balogh, L; Krenacs, T (2011) "DNA fragmentation-driven tumor cell degradation induced by modulated electro-hyperthermia" *Virchows Arch* **459** (Suppl 1):S204-205
2. Meggyeshazi, N; Andocs, G; Krenacs, T (2012) "Modulated electro-hyperthermia induced programmed cell death in HT29 colorectal carcinoma xenograft" *Virchows Arch* **461** (Suppl 1):S131–S132
3. Teleki, I, Szasz, M. A., Kulka, J. Meggyeshazi, N.;Kiszner, G.; Balla, B.; Krenacs, T. (2013) "Expression and potential involvement of connexins in breast cancer progression" *Virchows Arch* **463** (2) 260-261
4. Kiszner, G., Teleki, I.; Meggyeshazi, N.; Balla, P.; Maros, M. E.; Nemeth, I. B.; Varga, E.; Korom, I.; Krenacs, T. (2013) "Exploring connexin expression in melanocytic tumors" *Virchows Arch* **463** (2) 284
5. Meggyeshazi, N.; Andocs, G.; Spisak, S.; Kiszner, G.; Balla, P.; Balogh, L.; Krenacs, T. (2013) "Modulated electrohyperthermia causes caspase independent programmed cell death in HT29 colon cancer xenografts" *Virchows Arch* **463** (2) 329