A decorin szerepe a hepatokarcinogenezisben

Doktori tézisek

Horváth Zsolt

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Baghy Kornélia, PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:
Dr. Lotz Gábor, PhD, egyetemi docens
Dr. Than Nándor Gábor, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Kulka Janina, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Pápai Zsuzsanna, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Rónai Zsolt, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

A májrákok epidemiológiája összetett, és nehézséget jelent a nagy számú másodlagos daganat elkülönítése a primer tumoroktól. A hepatocelluláris karcinóma (HCC) a leggyakoribb primer májdaganat, de meg kell említeni a jóval ritkább a cholangiokarcinómát, az angioszarkómát illetve a gyermekkori hepatoblasztómát, melyek szintén primer eredetű májtumorok.

Rossz prognózisa miatt a HCC okozta elhalálozás a daganatos megbetegedések között a 2. helyen áll; a mortalitás/incidencia arány 0,95. 2012-ben 745 000 halálesetet okozott hepatocelluláris karcinóma (ez az összes daganatos elhalálozás 9,1%-a).

Habár a HCC egy gyorsan progrediáló, halálos kimenetelű betegség, amelynek terápiája mind a mai napig nem kielégítő, megelőzésének elősegítésére számos információ áll rendelkezésünkre. A tartós HBV vagy HCV hepatitis vírusfertőzés felelős a májrákok háromnegyedéért világszerte, így e fertőzések megelőzése az esetszám csökkentésének egy lehetséges módja. A fertőzés krónikus májgyulladást okoz, amely fokozott regenerációt, és fibrotikus, majd cirrhotikus folyamatokat indukál a májszövetben. Ez olyan diszplasztikus sejtcsoportok (fókuszok, nodulusok) létrejöttét okozza, amelyből később karcinóma alakulhat ki, de a cirrhotikus talajon közvetlenül is kifejlődhet a HCC. Azokban az esetekben, ahol nincs vírusfertőzés, a májszövet krónikus károsodása válthatja ki a daganatképződést; alkohol abúzus, vagy olyan direkt genotoxikus szerek, mint az aflatoxin B1, szintén a HCC kialakulását segítik elő. A szakirodalom beszámol további olyan életmóddal járó, illetve öröklött okozati

faktorok közreműködéséről is, mint a dohányzás, obezitás, diabétesz vagy a fogamzásgátlók használata, amelyeknek szerepük lehet a HCC kialakulásában.

A HCC molekuláris szinten igen polimorf betegség. Ezt a komplexitást részben az etiológia, részben a kialakulás mögött meghúzódó szerteágazó patogén folyamatok magyarázzák. A HCC progressziója során számos jelátviteli útvonal és közvetítő molekula (pl. WNT/β-catenin, PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK, HGF/MET, EGFR, IGF, VEGF és PDGF) működésében figyeltek már meg zavart, ugyanakkor a kötőszövet szerepe a HCC progressziójában kevéssé feltárt terület.
Minden szövet és szerv, így a máj szövete is tartalmaz egy nem-sejtes alkotóelemekből felépülő, jól szervezett hálózatot, amelyet extracelluláris mátrixnak nevezünk (ECM). Az ECM nemcsak szöveti szerkezetet biztosít, amelybe az alapszöveti sejtek beágyazódhatnak, de számos olyan sejtélettani folyamatot is szabályozni képes, mint a növekedés, migráció, differenciáció, túlélés, homeosztázis és morfogenezis. Az ECM-et sokféle makromolekula alkotja, összetétele szövetenként eltérő és specifikus. Az ECM fő alkotóelemei olyan rostalkotó fehérjék/makromolekulák, mint a kollagének, az elasztin, a fibronektin, a lamininek, a glikoproteinek, a proteoglikánok és a glükózaminoglikánok. Ezek mind erősen savas és hidratált molekulák, amelyek összekapcsolódva nagyméretű fibrilláris struktúrákat hoznak létre.

Az ECM nemcsak fiziológiás folyamatokban fontos résztvevő, de a szöveti mikrokörnyezetnek a malignus fenotípus kialakulásában és a tumorsejtek viselkedésének szabályozásában is nagy jelentősége van. Malignus transzformáció során a tumoros sejteket

körülvevő ECM olyan mennyiségi és minőségi változásokon megy keresztül, amelyek megváltoztatják az ECM dinamikus fel- és leépülésének szabályozását, így végső soron olyan kóros működéshez vezetnek, amely támogatni képes a daganat fejlődését.
A primer hepatocelluláris karcinóma gyakran alakul ki cirrhosis vagy krónikus gyulladás okozta fibrosis talaján, habár a tumor kialakulásának ez nem nélkülözhetetlen feltétele. Krónikus gyulladás során egyrészt a felgyorsult hepatocita regeneráció miatt a DNS hibajavítás mértéke elégtelenné válik, így mutációk halmozódnak fel a májsejtekben, másrészt az extracelluláris mátrix kóros átalakulása a szöveti környezetben jelenlévő jelátviteli faktorok mennyiségét, lokalizációját és szerepét is módosítja, tönkretéve ezzel az eredeti, normális funkciót.

A decorin az ECM egy kisméretű, leucin-gazdag proteoglikánja (SLRP), amely egy kis méretű központi fehérje vázból (core protein), és egy O-glikozidos kötéssel kapcsolódó GAG oldalláncból épül fel. Mind a fehérje váz, mind a GAG oldallánc számos olyan molekulát képes megkötni, amelyek különféle jelátviteli útvonalak működésében játszanak fontos szerepet. Ennek megfelelően a decorin szabályozni képes a fiziológiás és tumoros mikrokörnyezetet, és jellemzően tumorgátló hatása van. 2012-ben már a „mátrix őrmolekulájaként” említik analógiában a p53 fehérjével, amely a „genom őre”.
A decorin hiánya a tumorstrómából korrelál a rosszabb túléléssel, invazív emlődaganatos betegeknél. Előbbiek mellett, számos daganat strómájában jelentősen lecsökken a decorin mennyisége, így a hólyagrákok esetében is, ahol a normál hólyagstrómában egyébként a decorin nagy mennyiségben van jelen. A decorin és p53 kettős mutáns egerek (DCN−/−; TP53−/−) jóval

korábban elpusztulnak a bennük kialakuló agresszív T-sejtes limfómában, mint a csak p53 mutációt hordozó társaik. Ugyanakkor a szolubilis decorin szisztémás bejuttatása a szervezetbe (pl.: adenovírus segítségével) számos szolid tumor esetében szignifikáns módon csökkenti a neoangiogenezist.
További kísérletes megfigyelések igazolták, hogy a decorin képes olyan sejtfelszíni tirozin kináz receptorokhoz kapcsolódni, mint az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor), a Met receptor, vagy IGFR, és így több olyan faktor növekedési faktor antagonistája, amelyeknek szerepük van a sejtciklus, illetve proliferáció szabályozásában. Az ektopikus decorin expresszió számos, különböző szöveti eredetű neoplasztikus sejtvonal proliferációját gátolta. Az ilyen, stabil transzfektánsokban a sejtciklus gátlása jellemzően a $p21^{WAF1/Cip1}$ útvonalon keresztül valósult meg, mivel olyan sejtvonalban (pl.: HCT116 humán vastagbél karcinóma), ahol a p21 nem funkcionál, a decorin okozta proliferációgátlás sem volt megfigyelhető.
Ezen felül a decorin képes megkötni, és ezzel blokkolni a TGFβ növekedési faktort, ezzel is gátolva egyes sejtek növekedését.
Ezek a megfigyelések a decorin tumorszupresszor szerepét igazolták, és ennek megfelelően potenciális terápiás faktorként is érdemes lehet rá tekinteni, amely akár önmagában, akár kemoterápiás szerekkel kombinálva gátolhatja a tumorprogressziót és a metasztázist.

Munkacsoportunk korábban vizsgálta a decorin szerepét a májfibrosisban és annak regenerációjában, és kapcsolatát a TGFβ-val fibrosis és májcirrhosis során. Azonban a decorin hatását a hepatocelluláris karcinóma kialakulásában és fejlődésében eddig még nem tárták fel.

Ennek megfelelően egyrészt hepatóma sejtvonalakon (HepG2, Hep3B, HuH7 és HLE) végeztünk *in vitro* vizsgálatokat, amelyekben a sejteket exogén humán rekombináns decorinnal kezeltük, másrészt vad típusú, valamint decorin hiányos ($Dcn^{-/-}$) egerekben indukáltunk májdaganatokat *in vivo*, ezzel vizsgálva a decorin szerepét a hepatokarcinogenezisben.

2. Célkitűzések

1. Habár korábban már igazolták, hogy egyes hepatóma sejtekre anti-proliferatív hatással lehet a decorin, célunknak tűztük ki, hogy felderítsük, képes-e a humán rekombináns decorin kezelés gátolni a többféle hepatocelluláris karcinóma sejtvonal proliferációját, a növekedésgátlás általánosnak mondható-e a hepatómák között, vagy sem.
2. Hogy az *in vitro* megfigyeléseket *in vivo* eredményekkel egészíthessük ki, kísérletes hepatokarcinogenezisben kívántuk vizsgálni a decorin szerepét vad típusú és decorin hiányos ($Dcn^{-/-}$) egerek összehasonlítása nyomán,.
3. További célunk volt a megfigyelt hatások kiváltásáért felelős jelátviteli útvonalak feltérképezése, a résztvevő molekulák mennyiségi és minőségi változásainak kimutatása, valamint további lehetséges target molekulák azonosítása.
4. Ezen felül vizsgálataink kiértékelése nyomán átfogó képet kialakítani a decorin szerepéről a hepatokarcinogenezisben.

3. Módszerek

***In vitro* vizsgálatok:** Hepatóma sejtvonalakat (HepG2, Hep3B, HuH7 és HLE) alkalmaztunk. Munkacsoportunk által előállított humán rekombináns decorinnal kezeltük a sejteket, amelyek proliferációját vizsgáltuk MTT teszt segítségével, valamint kísérleti mintákat hoztunk létre további vizsgálatokhoz.

In vivo* vizsgálatok*: C57Bl/6, és decorin knock-out egereket tioacetamid (TA) és dietil-nitrózamin (DEN) hepatokarcinogén szerekkel kezeltük, ezzel májrákot indukáltunk bennük.

A szövettenyészeti sejtkultúrákból és az állatkísérletekből származó mintákat a továbbiakban molekuláris vizsgálatokhoz használtuk fel.

mRNS expresszió vizsgálatok: Az RNS-t a fagyaszott májszövetből és a TRI reagensben felvett sejtekből izoláltuk, majd reverz transzkripciót követően az alábbi célgéneket vizsgáltuk egerekben: CDKN1A, AP4, GS, AFP, és humán sejtvonalon: WEE1, CDC25A. Az eredményeket CT értékekben kifejezve kaptuk, a relatív expressziót a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel számoltuk ki.

Fehérje aktivitás, lokalizáció és expresszió vizsgálatok: A tirozin kináz receptorok aktivitásának méréséhez a receptorok relatív foszforiláltságát RTK Proteome Profiler Array segítségével vizsgáltuk. Az egyes célmolekulák lokalizációjának meghatározásához **ICC és IHC** módszereket alkalmaztunk a megfelelő ellenanyagokkal. Fehérje mennyiségi összehasonlító vizsgálatokhoz **Western blot** technikát alkalmaztunk. A vizsgált targetmolekulák: *decorin, c-Myc, foszfo-c-Myc (Thr58), p44/42 MAP kináz, foszfo-p44/42 MAP kináz (Thr202/204), β-Catenin, foszfo-β-Catenin (Ser33/34/Thr41),* $p21^{Waf1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$, *Pan-Akt, foszfo-Akt (Thr308), GSK3β, foszfo-GSK3α/β (Ser21/9), foszfo-Rb (Ser780), foszfo-Rb (Thr821), foszfo-CDK1 (Tyr9), PDGFRα, PDGF AB, p-Y.*

A sejtek TGF-β1 termelését az R&D Systems „Solid Phase Sandwich **ELISA** kit" segítségével mértük.

A statisztikai vizsgálatokat legalább három független mérés segítségével végeztük, mely során átlagot és szórást számoltunk. A számításokat a GraphPad Prism 4.03 szoftver segítségével végeztünk el. Az adatok normál eloszlását a D'Agostino & Pearson teszt segítségével vizsgáltuk. A kapott különbségek szignifikanciájának

megállapítását az adatok eloszlásától függően nem parametrikus, Mann-Whitney próbával, vagy Student-féle t-teszttel végeztük. A vad típusú, és Dcn knock-out csoportok tumor-előfordulásának különbségeit és az eltérések szignifikanciáját χ-négyzet próbával értékeltük. Az egymástól függetlenül elvégzett, ismételt kísérletek eredményeinek összevetésével igazoltuk a kísérletek reprodukálhatóságát. Csak az ismételhető, szignifikáns eltéréseket tartottuk valóban szignifikánsnak. A szignifikanciát a gyakorlatban is általánosan használt $p < 0,05$ szinten állapítottuk meg.

4. Eredmények

In vitro kísérletek eredményei

HepG2: A decorin csökkentette a sejtek proliferációját 72 óra alatt. A vizsgált sejtfelszíni RTK-k közül egyedül az EGFR volt aktív. A foszfo-EGFR szintje jelentősen lecsökkent 48 h decorin kezelést követően, koncentrációfüggő módon, ezzel párhuzamosan pedig ERK1 és ERK2 defoszforilációját figyeltük meg. A $p21^{WAF1/CIP1}$ fehérje mennyisége 4,8-szorosára és 3,7-szeresére emelkedett a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kontrollhoz képest, míg a $p27^{KIP1}$ szintje 1,74-szeresére és 1,5-szörösére növekedett. Ezen felül a decorin a HepG2 sejtekben csökkent GSK3α/β foszforilációhoz, valamint emelkedett foszfo-β-catenin mennyiséghez vezetett. Emellett, a β-catenint eltűnni láttuk a HepG2 sejtek magjából, és a sejtmembránban jelent meg az immuncitokémiai vizsgálatok során. A decorin szignifikánsan csökkentette a sejtek TGF-β1 szekrécióját is.

Hep3B: A Hep3B proliferációja szignifikáns módon csökkent decorin kezelés hatására. A sejteken a EGFR, InsR és IGF-IR foszforiláció-változást detektáktunk a tirozin kináz array-en. A HepG2-höz hasonló módon, az EGFR foszfoprotein szignifikáns csökkenését figyeltük meg, azonban az InsR és IGF-IR receptorok aktivációjában fokozódást tapasztaltunk. Az IGF és inzulin receptorok aktivációjával párhuzamosan jelentősen nőtt az Akt foszforilációja a fehérje 308-as treoninján. Emellett, ugyan az ERK1 foszforilációjában 37%-os növekedést detektáltunk mindkét kezelt csoportban, de szignifikáns változást az pERK2 szintjében nem figyeltünk meg. Habár sem a kezeletlen kontrollból, sem a decorin kezelt Hep3B sejtekből nem tudtunk $p21^{WAF1/CIP1}$-et kimutatni, ugyanakkor a $p27^{KIP1}$ fehérje mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott 48 óra decorin kezelést követően. A foszfo-GSK3β mennyiségében sikerült egy kis mértékű növekedést kimutatni, ugyanakkor szignifikáns változást sem a foszfo-c-Myc, sem a foszfo-β-catenin mennyiségében nem találtunk. További vizsgálatainkban kimutattuk, hogya Hep3B sejtekben a decorin kezelés indukálja a CDK1 foszforilációját, valamint ezzel párhuzamosan a WEE1 mRNS expressziója is megnövekszik. Ezen felül a decorin a sejtek TGF-β1 szekrécióját csökkenti.

HuH7: A HuH7 sejtek esetén a decorin proliferáció gátló hatását csak 48 órás kezelés után figyeltük meg. A Hep3B-hez hasonlóan, a sejteken aktivált EGFR, InsR és IGF-IR receptorok találhatóak. Az EGFR foszforilációja decorin kezelést követően dózisfüggő módon, szignifikánsan csökkent. Az InsR és IGF-IR receptorok foszforilációjában szignifikáns eltérést csak a DCN100 csoportban tudtunk kimutatni; a foszforiláció mértéke 34%-kal csökkent az InsR, és 28%-kal az IGF-IR esetében. Előbbiekkel összefüggésben a foszforilált Akt mennyisége is lecsökkent. Mindezzel szemben azonban jelentős ERK aktivációt detektáltunk a kezelést követően; míg 2,80-szoros és 3,93-szoros növekedést figyeltünk meg az foszfo-ERK1 mennyiségében, addig 12,74-szoros és 19,83-szoros volt a pERK2 emelkedés DCN50 és DCN100 csoportokban a kontrollhoz képest. A $p21^{WAF1/CIP1}$ CDK inhibitort sem a kontroll, sem a kezelt HuH7 sejtekből nem tudtuk kimutatni, és a $p27^{KIP1}$ esetében is csak kis mértékű, nem szignifikáns változást figyeltünk csak meg. A GSK3β foszforiláció a DCN50 csoportban habár megemelkedett 32%-kal, a DCN100 kezelési csoportban foszfo-GSK3α-hoz hasonlóan látványosan, 62%-kal lecsökkent. A fentiek mellett jelentős c-Myc foszforilációt detektáltunk a 48 órás decorin kezelés hatására, de foszforilált β-catenint a HuH7 sejtekből nem sikerült kimutatnunk. Szignifikáns változást a szekretált TGF-β1 koncentrációban nem tudtunk kimutatni a sejtek decorin kezelését követően.

HLE: A fibroblaszt-szerű HLE sejteknél csak kismértékű, nem-szignifikáns proliferáció-csökkenést tudtunk kimutatni decorin kezelés hatására, és aktív, foszforilált tirozin kináz receptort sem detektáltunk a sejteken. Ennek ellenére jelentős, 66%-os és 64%-os csökkenést tapasztaltunk az Akt foszforilációjában a DCN50 és DCN100 csoportokban a kontroll sejtekhez viszonyítva. Érdemi változást az ERK1/2 foszforilációjában nem figyeltünk meg. Amíg a $p27^{KIP1}$ nem változott a decorin jelenlétében, a $p21^{WAF1/CIP1}$ mennyisége szignifikáns módon megemelkedett. A GSK3 fehérjék foszforilációjában csak enyhe csökkenést tapasztaltunk, ellenben a magasabb kezelési koncentráció hatására a foszfo-c-Myc mennyiségében 37%-os növekedést figyeltünk meg. Ezen felül jelentős β-catenin foszforilációt detektáltunk; 2.76-szoros növekedést

a DCN50 csoportban, és 3.07-szoros növekedés a DCN100, amit immunhiszokémia segítségével sikerült alátámasztanunk. A decorin a HLE sejtek TGF-β1 szekrécióját csökkentette a legnagyobb mértékben.

Állatkísérletek eredményei

Fenotípusos változások

Az eltérő hepatokarcinogenezis modellek a vártnak megfelelően más fenotípusú tumorokat eredményeztek. A tioacetamid (TA) metabolizmusa a hepatocitákban a citokróm p450-en keresztül valósul meg, amely először fibrosishoz, majd cirrhosishoz vezet. Ennek megfelelően, a TA kezelés fokozott hepatocita regenerációt okozott, ami a hepatokarcinogenezis iniciátora a cirrhotikus májban. A TA-indukált tumorsejtben a citoplazma mennyiségének emelkedése volt megfigyelhető, erős eosinophil festődéssel, a tumorokat jellemzően kötőszövetes tok vette körül. Ezzel szemben a nagy dózisú dietil-nitrózamin (DEN) adása közvetlen DNS károsodást okoz, fibrotikus változások nélkül. Ezek a tumorsejtek kis méretűek, basophil festődésű citoplazmával, valamint gyakran törtek be az erekbe.

A decorin hiányos egerek 93%-ában fejlődött makroszkóposan is megfigyelhető májdaganat TA-kezelés hatására, amíg a vad típusú állatoknál ez csak 22% volt. A DEN kezelés a $Dcn^{-/-}$ állatok 44%-ban vezetett tumorok kialakuláshoz szemben a vad-típusú állatoknál megfigyelt 27%-kal, bár ez az eredmény nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. Ezzel párhuzamosan, szignifikánsan magasabb tumortérfogatot mértünk a decorin hiányos állatokban, mint a vad típusú egerekben.

Molekuláris változások

Négy tirozin kináz receptort azonosítottunk, nevezetesen a PDGFRα-t, az EGFR-t, az MSPR-t (más néven RON-t) és az IGF-IR-t, amelyek

decorin hiányában mindkét kezelés során szignifikánsan magasabb szinten foszforilálódtak.

Mivel a legmarkánsabb változást a pPDGFR mennyiségének változásában detektáltuk, ezért PDGFRα receptort vetettük további vizsgálatok alá. Kimutattuk, hogy a PDGFRα egészséges májban főleg az olyan nem parenchyma típusú sejtekben lokalizálódik mint a fibroblasztok, vagy myofibroblasztok, azonban megjelenhet a tumorsejtek felszínén is. Mivel kettős immunfestés nyomán megállapítottuk, hogy a decorin és a PDGFRα nem kolokalizál, megvizsgáltuk, hogy vajon a decorin képes-e közvetlenül kötni a PDGF ligandot. Immobilizált humán rekombináns decorint inkubáltunk PDGF AB-vel, majd PDGF AB specifikus antitesttel immunreakciót végeztünk. Ennek eredményeképp a decorint tartalmazó membránpontokon megjelent a PDGF specifikus jel, így megállapítottuk, hogy a decorin képes megkötni közvetlenül a PDGF-et.

Mivel a decorin közismerten $p21^{WAF1/CIP1}$-en keresztül fejti ki tumorszupresszor hatását a legtöbb esetben, ellenőriztük, hogy vajon a saját kísérleti rendszerünkben is hasonlóan tapasztaljuk-e. A kontroll, kezeletlen állatokban a p21 alacsony szintjét mutattuk ki immunhisztokémia segítségével mind a vad típusú, mind a decorin hiányos egerek májában. TA kezelés hatására jelentős növekedés volt megfigyelhető a p21 mennyiségében vad-típusú állatok mintáiban. A hepatociták, kötőszöveti sejtek, valamint a tumorsejtek is intenzív immunfestődést mutattak. Ezzel szemben a decorin hiányos egerekben a p21 felhalmozódása nem volt megfigyelhető, a tumorsejtek magjából pedig szinte teljesen hiányzott. A DEN kezelés is megemelte a p21 szintjét a sejtekben, de a decorin hiánya itt jóval kevésbé befolyásolta a folyamatot. A sejtciklus G1/S átmenet szabályozásának pontosabb megértéséhez a retinoblasztóma (Rb) fehérje különböző foszforilációs helyeinek állapotát vizsgáltuk meg a kísérleti modelleinkben, foszfo-specifikus ellenanyagok segítségével (Ser780 és Thr821). A TA-indukált májtumorokban kifejezett Rb foszforiláció volt megfigyelhető a Ser780 pozícióban, amely a CDK4-n keresztül

szabályozódik, és amely jóval kifejezettebb volt a $Dcn^{-/-}$ mintákban, mint a vad típusúakban (2,65-szoros, és 1,77-szoros növekedés). A DEN kezelés 40%-kal magasabb Rb-foszforilációt eredményezett a Ser780 foszforilációs helyen a decorin hiányos állatokban, mint a vad típusú társaikban. Thr821 hely foszforilációjáért a CDK2 felel. A TA és DEN kezelések ugyan minden esetben növelték a Thr821 foszforilációját a retinoblasztomán, különbséget a vad típusú és a decorin hiányos egerek között nem tudtunk kimutatni.

További vizsgálataink során a c-Myc foszforilációjának erős citoplazmás akkumulációját figyeltünk meg a vad típusú állatok tumoros és nem tumoros sejtjeiben egyaránt, a kezelés típusától függetlenül. Ezzel szemben, a decorin hiányos tumorsejtek kevesebb foszfo-c-Myc-et tartalmaztak, mint az őket körülvevő szövet.

A TA kezelés megnövelte a β-catenin mennyiségét; erős immunfestődést tapasztaltunk a cirrhotikus területeken, különösen a proliferáló epeutak mentén. Ugyanakkor, néhány kivételtől eltekintve, ahol a β-catenin citoplazmás, vagy gyenge magi lokalizációt mutatott, a legtöbb hepatocitában és tumorsejtben a β-catenin továbbra is a membránban lokalizálódott. Ezzel szemben a DEN-indukált májdaganatok esetén a fehérje jelentős transzlokációt mutatott a membránból a sejtmagba, valamint szignifikánsan kevesebb volt az inaktivált foszfo-β-catenin a decorin deficiens májakban, mint a vad típusúakban.

A kontroll mintákban a foszfo-Akt nem volt kimutatható, ugyanakkor TA és DEN kezelésre a mennyisége drámaian megemelkedett. A decorin hiányos tumorokban szignifikánsan magasabb foszfo-Akt szintet detektáltunk, eszerint az Akt útvonal a decorin hiányában aktiválódik a kísérletes hepatokarcinogenezis során.

A foszfo-GSK3α és foszfo-GSK3β inaktív formák mennyisége megemelkedett a TA kezelés hatására. Ugyanezt a hatást láttuk a DEN-kezelés következtében is, azonban érdekes módon nem láttunk különbséget a p-GSK3β mennyiségében a genotípusok között egyik kezelés hatására sem, de a kontroll, kezeletlen mintákban sem.

A jelátviteli mediátorok közül a leginkább szembetűnő változást az ERK1/2 fehérjék esetén detektáltuk. A p-ERK1 szintje, összevetve az összfehérje szintjével, 2,3-szorosára, illetve 3,6-szorosára emelkedett TA-kezelés hatására a vad típusú és a $Dcn^{-/-}$ mintákban. A tioacetamid 4,7-szeres növekedést indukált a p-ERK2 szintjében a decorin hiányos állatokban, míg a vad típusúakban ez az érték csak 1,24-szeres emelkedés volt. A DEN-kezelt vad típusú mintákkal ellentétben, a decorin hiányos egerekben ERK1/2 aktivációt mutattunk ki, 2,9-szeres és 5,3-szoros növekedést a p-ERK1 és p-ERK2 szintében. Ennek megfelelően az ERK1/2 útvonal decorin hiányában folyamatosan aktivált.

5. Következtetések

Igazoltuk a decorin tumorgátló hatását hepatóma sejtvonalakon *in vitro*. Egy kivételével a sejtvonalak jelentős proliferáció csökkenéssel reagáltak a decorin kezelésre. HLE sejtvonal esetén csupán minimális csökkenést láttunk. A decorin kezelés ennek megfelelően minden sejtben okozott molekuláris változásokat, amelyek azonban az egyes sejtvonalakban eltérőnek mutatkoztak. Amíg a HepG2 sejtek esetében a szakirodalomban is ismeretes, kanonikus jelátviteli útvonal aktiválódik, amely EGFR aktiváció gátlásával és $p21^{WAF1/CIP1}$ expresszió növekedéssel jár, addig a Hep3B és HuH7 sejtekben a hatást inkább az inzulin és IGF-IR receptorok közvetítették. G2/M fázisblokkot mutattunk ki a Hep3B sejtekben, amely a decorin eddig ismeretlen hatása. A HLE sejtek esetében tapasztalt lecsökkent TGFβ1 szekréció alapján feltételezzük, hogy ezeknél a sejteknél a decorin inkább a migrációra van hatással a proliferáció helyett.

In vivo, a decorin hatékonyabbnak bizonyult a TA-kezelés során, mivel hiányában a tumorigenezis kifejezettebb volt, mint a DEN-indukált májdaganatok esetén, ahol nem alakul ki cirrhosis a kezelés hatására. A cirrhotikus májban a decorin a fibrotikus szeptumok mentén halmozódik fel, valamint a tumorok körüli kötőszövetben figyelhető meg, amíg a cirrhosis nélküli, DEN-kezelt májakban jóval kevesebb decorin látható. Megjegyezendő, hogy az extracelluláris mátrix MMP-k által történő fokozott degradációja mind a fibrogenezis során mind a karcinogenezisben gyakori folyamat. Ezek fényében feltételezzük, hogy a decorin az MMP működés hatására képes a kollagénhez kötött állapotából felszabadulni, ami a szolubilis proteoglikán helyi felhalmozódását okozza az tumor invazív frontján. Ha ez így van, akkor TA-kezelés során a decorin mennyisége a kötőszövetes felhalmozódás következtében eleve magasabb, mint a cirrhosistól mentes májtumorok fejlődése során. Ez eredményezheti a decorin hangsúlyosabb tumornövekedés gátló hatását a TA-indukált májrákokban.

A decorin gén kiütése megnövelte a PDGFRa, EGFR, RON és IGF-IR tirozin kináz receptorok alapaktivitását, ennek következében pedig a sejtnövekedést támogató és a túlélést elősegítő szignálok felerősödtek a tumorokban. A decorint nélkülöző szöveti környezet és az ebből származó RTK aktiváció olyan körülményeket hoznak étre,

amelyben a Ras/MEK/ERK útvonal tartósan aktiválódhat. Kísérleteink során ez a jelátviteli út bizonyult a legfőbb szignáltranszdukciós útvonalnak. Mindemellett, fontos szerepet tulajdoníthatunk az Akt aktivációnak, amelyet a c-Myc és a β-catenin degradációjának gátlásával együtt figyeltünk meg. A sejtmagban c-Myc képes az AP4 transzkripciós faktor indukására, amely ismert transzkripciós represszora $p21^{Waf1/Cip1}$ tumorszuppresszor fehérjének. Ennek következtében a lecsökkent $p21^{Waf1/Cip1}$ szint már nem lesz elegendő a CDK4/Cyclin4 komplex gátlására, amely a retinoblasztóma fehérje foszforilálásán keresztül E2F felszabadulást okoz, ennek eredménye pedig, hogy a sejt keresztülhaladhat a G1 fázis restrikciós pontján.

Ezen felül kimutattuk, hogy a decorin gátolja a PDGF receptort a hepatokarcinogenezis során, amely hatást valószínűleg nem a receptor közvetlen blokkolásával ér el, hanem annak PDGF AB ligandját köti meg.

A decorin és a hepatocelluláris karcinóma kapcsolatával kapcsolatos új megállapításaim:

1. A decorin a különböző hepatóma sejtvonalakban eltérő jelátviteli útvonalakon keresztül fejti ki tumorszupresszor hatását.
   a. habár a decorin jellemzően a G1 fázis blokkját okozza a sejtciklusban a $p21^{WAF1/CIP1}$ indukcióján keresztül,
   b. ahogy a Hep3B sejtekben láthattuk, G2 fázis blokkot is előidézhet, ha a körülmények ezt teszik lehetővé
   c. a decorin közvetlen célpontja lehet az inzulin és IGF-IR receptoroknak is, azok foszforilációját kísérletesen növelni és csökkenteni is képes volt
2. A decorin hiánya az indukált hepatokarcinogenezis során kedvez a tumor progressziónak. A decorin hiányos állatokban mindkét modellük esetén nagyobb számú és térfogatú májdaganat alakult ki a vad típussal összehasonlítva és ez a különbség a TA kezelt állatokban kifejezettebb volt.
3. A TA kezelt állatokban a decorin jelenléte vagy hiánya inkább a RTK/Ras/MAPK útvonalat befolyásolta, míg a DEN kezelt állatokban a β-catenin szerepe volt inkább kifejezett.

4. A decorin hiánya konstitutívan aktív tirozin kináz receptorokat eredményez, amelyek közül a decorin lehetséges célpontjaként a MSPR/RON receptort korábban még nem azonosították.
5. A PDGFRα receptoraktivációt a decorin valószínűleg nem közvetlenül gátolja, hanem annak ligandjának megkötésével, így megakadályozza, hogy a PDGF a receptorához kapcsolódhasson.

6. Sajátpublikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

1. Baghy, K., **Horvath, Z**., Regos, E., Kiss, K., Schaff, Z., Iozzo, R. V., & Kovalszky, I. Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis. The FEBS journal. 2013;280(10):2150-64.

2. **Horvath, Z**., Kovalszky, I., Fullar, A., Kiss, K., Schaff, Z., Iozzo, R. V., & Baghy, K. Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis. Matrix Biol. 2014;35:194-205.

3. **Horvath, Z**., Reszegi A, Szilak L, Kovalszky I, Baghy K., Tumorspecific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. BMC Cancer, 2018. Submitted.

7. Köszönetnyilvánítás

- Elsősorban külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Baghy Kornéliának**, aki már egyetemi éveimtől kezdve tanított, támogatott és folyamatos szakmai és lelki segítséget nyújtott. Doktori munkám nélküle nem jöhetett volna létre.
- Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kovalszky Ilona professzor asszonynak, hogy az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Ph.D. programjában lehetőséget biztosított a kutatáshoz, és hogy minden alkalommal, építő szakmai véleményét, tanácsait megosztotta velem.
- Köszönettel tartozom Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy a Ph.D. munkámat az Intézetben végezhettem.
- Dr. Sebestyén Anna házi opponensemnek a doktori dolgozatom elbírálását és hasznos tanácsait.
- Köszönöm a jelenleg hivatalos nevén Molekuláris Patológiának nevezett ám tradicionálisan csak mindenki által Biokémia laborként ismert laboratórium minden volt és jelenlegi munkatársának, közvetlen munkatársaimnak, név szerint: dr. Kiss Katalinnak, Egedi Krisztinának, Oláhné Nagy Júliának, Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Fullár Alexandrának, Csorba Gézáné Maricának, Dr. Hollósi Péternek, Császár Krisztinának, Rada Kristófnak, Reszegi Andreának és Dr. Jeney András professzor úrnak, akik munkám elvégzéséhez szakmai támogatást adtak és segítő baráti légkört teremtettek.
- Köszönöm az Állatház dolgozóinak, név szerint Sztodola Andrásnak és Borza Mónikának, az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért és odaadó munkájukért
- Köszönöm az Intézet minden volt és jelenlegi munkatársainak, hogy segítették munkámat.
- Nem utolsó sorban hálámat szeretném kifejezni családomnak, akik szeretettel, gondoskodással és türelemmel végigkísérték eddigi munkámat.