

A syndecan-1 szerepe a máj fibrogenézisében

Doktori értekezés

Timkóné Dr. Regős Eszter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Kovalszky Ilona DSc, professor emerita
Dr. Baghy Kornélia PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tőke Judit PhD, egyetemi adjunktus
Rubovszkyné Dr. Gallai Mónika PhD, biológus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalay Ferenc DSc, professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Antal Imre PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Tóth Erika PhD, osztályvezető főorvos

Budapest
2019

I. BEVEZETÉS

A májszerkezet kóros átépülésével és a kötőszöveti elemek felhalmozódásával jellemezhető májcirrhosis súlyos, gyakran életveszélyes szövődményekkel járó betegség, amely a mai napig komoly egészségügyi gondot jelent világszerte. Ilyen kóros kötőszöveti felhalmozódást, májfibrózist okozhatnak a vírusfertőzések (hepatitis B és C vírusok), a kóros alkoholfogyasztás, az egyes anyagcsere betegségek (Wilson-kór, haemochromatosis), autoimmun betegségek (autoimmun hepatitis, primer biliaris cirrhosis), illetve az alfatoxinnal szennyezett élelmiszerek fogyasztása. A riasztó adatok ellenére a kialakult májcirrhosis visszafordítására hatékony, konzervatív terápia továbbra sem áll rendelkezésre, tartós gyógyulást még mindig csak a máj transzplantáció ígér. Tekintettel az elérhető donor májak alacsony számára a megfelelő recipiens kiválasztása a transzplantációval foglalkozó szakemberek egyik legnehezebb feladata. A recipiens kiválasztása során az objektív döntések meghozatalához különböző score rendszerek nyújtanak segítséget. A MELD score („Model for end-stage liver disease”) kizárólag objektív labor értékeket vesznek alapul, mint a szérum bilirubin és kreatinin valamint az INR. A MELD-score a rövid távú, három hónapon belüli mortalitás jó prognosztikai markerének bizonyult, azonban a pontrendszer hasznossága mellett figyelembe kell venni a korlátait is. Például a májbetegségekhez kapcsolódó vérzés zavar során a score rendszerek csak az INR-t veszik alapul, azonban a vérzés zavar egyéb okait például a thrombocytá diszfunkciót figyelmen kívül hagyják. A fent említettek alapján a májcirrhosis kialakulása molekuláris mechanizmusainak jobb megismerése újabb terápiás célpontok és diagnosztikus eszközök kifejlesztését teheti lehetővé.

A máj fibrosisa során fokozott kötőszöveti felhalmozódásáról beszélünk, ami a kötőszövet szintézis és lebontás egyensúlyának felbomlása miatt alakul ki. A májat érintő károsító ágensek hatására lymphocytá infiltráció, és a Kupffer sejtek aktivációja figyelhető meg. A hepatocyták károsodása, illetve a gyulladásos folyamat a nyugalomban lévő HSC-sejteket aktiválja, azok myofibroblasttá alakulnak, melyek fontos szerepet játszanak a kötőszövet felhalmozódásában. A myofibroblastok extracelluláris mátrix komponenseket, mátrix metalloproteázokat, azok inhibitorait illetve autokrin módon ható TGF β -t termelnek.

A klasszikus elképzelés szerint az extracelluláris mátrix (ECM) pusztán a szövetek tartószerkezeteként szolgál, azonban az utóbbi évtizedek során bebizonyosodott, hogy az ECM fehérjék részt vesznek a sejtek növekedésének, migrációjának és differenciációjának szabályozásában is. Az ECM komplex hálózatának egyik proteoglikánjának, a syndecan-1-nek (CD138) vizsgáltuk a máj fibrogenézisében betöltött szerepét.

A proteoglikánok fehérjévézához O-glikozidos kötéssel szulfatált poliszacharid láncok (glükózaminoglikánok, GAG) kapcsolódnak. A GAG oldalláncok lehetnek heparán-szulfátok

(HS), chondroitin-szulfátok (CS), dermatán-szulfátok (DS) és keratán-szulfátok (KS). A syndecan-1 a transzmembrán proteoglikánok közé tartozó négytagú syndecan család tagja. Elnevezése a görög syndein (összekötni) szóból származik. Tengelyfehérjéjéhez heparán-szulfát és chondroitin-szulfát láncok kötődnek. Míg a molekula citoplazmatikus domain-je konzervált, az egyes fajok között azonos, addig az extracelluláris része eltérő, fajra specifikus szekvenciát mutat. A syndecan család tagjaira jellemző az ún. "vedlés" (shedding) mechanizmusa. A shedding során a tengelyfehérje membránhoz közel eső régiójában enzimátikus hasítás történik. Az így képződő fragment parakrin és autokrin szabályozó faktorként viselkedik, és a vérplazmában megjelenik. A lehasító enzimeket shedázoknak is nevezzük, melyek közül legismertebbek az MMP-2, -9, -7, az MT1-MMP (MMP-14) és az MT3-MMP. Az érett, felnőtt szövetben syndecan-1 döntően az epithelialis szöveteken, valamint a plazmasejtek és pre-B sejtek felszínén található.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatainak során már vizsgálta a syndecan-1 és más proteoglikánok változását a különböző májbetegségekben. Egészséges májban syndecan-1 főleg a hepatocyták basolaterális felszínén található, a többi sejten expressziójuk lényegesen kevesebb. A májfibrosisa során a syndecan-1 mennyisége megnő, elsősorban a hepatocyták ill. cholangiocyták felszínén, stromális reakció nem tapasztalható. Fibrotikus, illetve fibrosis nélküli hepatocellularis carcinomákat (HCC), illetve nem tumoros környezetüket vizsgálva azt láthatjuk, hogy a syndecan-1 mennyisége a cirrhosisal járó esetekben jobban megemelkedik.

II. CÉLKITÚZÉSEK

A korábbi eredményekre alapozva kívántuk megvizsgálni a syndecan-1 a májfibrogenézisben betöltött szerepét. A kérdés megválaszolásához első lépésben egy human syndecan-1-et stabilan termelő egér törzs létrehozása volt a cél, mely egér törzsben megfelelő kontroll állatok használata mellett kísérletes májfibrosist hoztunk létre, négy hónapon át vizsgálva a májfibrosis progresszióját. In vitro sejtes modell rendszerben myofibroblastok és syndecan-1 túltermelő és kontroll hepatocyták ko-kultúras modell rendszereivel kívántuk vizsgálni a TGF β 1 hatását. A fenti modell rendszerekben megvizsgáltuk a kötőszöveti fehérjék termelődését fehérje és mRNS szinten, valamint a kötőszöveti fehérjék lebontását végző proteázok aktivitását, továbbá a májfibrosis során fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak aktivációját is megmértük. Végül beteg anyagon vizsgáltuk a syndecan-1 mennyiségének változását klinikopatológiai adatok függvényében.

III. MÓDSZER

A transzgén egereket megrendelésünkre Dr. Szabó Gábor vezetésével a Központi Orvosi Kutatóintézetben készítették el. A transzgenikus konstrukcióban, melyet Dr. Szilák László készített, albumin promoter után klónozták a humán syndecan-1 cDNS szekvenciáját (mAlb/hSynd1). Az albumin promoter hatására a humán syndecan-1 konstitutív módon csak a hepatocyták felszínén termelődik.

A vad és humán syndecan-1 transzgén (hSDC1 +/+) állatokban thioacetamiddal (TA) májfibrosist indukáltunk. A thioacetamidot az állatok ivóvizében 300 mg/l koncentrációban hígítottuk, az állatok a kezelést 4 hetes koruktól kapták, a kezelést 4 hónapon át végeztük. Az állatok leölésekor nemcsak a májukat használtuk fel, hanem a vérüket is levettük, melyeket lecentrifugáltuk és a plazmát -80 °C-on tároltuk. Minden máj felét 10 %-os formalin oldatban fixáltuk, a másik felét -80 °C-on tároltuk. A formalinban fixált mintákat paraffinba ágyasztuk a patológián használt standard módszer szerint, majd hematoxilin-eosin és picrosirius-vörös festett metszeteket készítettünk.

In vitro kísérleteink során humán LX-2 immortalizált HSC sejtvonalat, valamint syndecan-1 transzfektált Hep3B és kontroll Hep3B (hepatocellularis carcinoma) sejtvonalak direkt és indirekt ko-kultúras modelljét használtuk. A sejtes modelleket szérumban éheztetés után TGFβ1 adásával indukáltuk az LX2 sejtek myofibroblasttá átalakulást.

Az in vivo kísérlet során a felhalmozódott kötőszövet mennyiségét az elkészült picrosirius-vörös metszetekről készült morfometriai analízissel megkaptuk a felhalmozódott kötőszövet százalékos arányát, a kollagén-1 mennyiségének változását pedig fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálattal és RT-PCR-el, valamint in vitro modell rendszerben a sejt kultúrák médiumában Dot-blottal követtük nyomon. In vivo és in vitro modellekben az SMA változását, mely az aktivált myofibroblastok markere, fluoreszcens immunhisztokémia mellett Western-blottal vizsgáltuk. A máj fibrogenézise szempontjából fontos jelátviteli utak aktivitásának vizsgálatát Western-blottal és RT-PCR-ak követtük nyomon. A jelátviteli utak vizsgálata során syndecan-1 jelenléte esetén a TGFβ-1 hatásának csökkenését tapasztaltuk, így megvizsgáltuk a syndecan-1 és a TGFβ-1 direkt kötésének lehetőségét is. A fehérje-proteoglikán kötés vizsgálata során PVDF membránhoz kötött rekombináns TGFβ-1-et syndecan-1 transzfektált Hep3B sejtek médiumával inkubáltuk, majd rajtuk syndecan-1 immunreakciót végeztünk megfelelő pozitív és negatív kontrollok mellett. A humán syndecan-1 és egér TGFβ-1 szérumban koncentrációját ELISA módszerrel vizsgáltuk. A humán, az egér syndecan-1 és az össz syndecan-1 mennyiségének változását az in vivo mintákból származó proteoglikán izolátumból Western-blot analízist végeztünk.

Az eltérő etiológiájú formalinban fixált, paraffinba ágyazott humán cirrhotikus máj blokkból két-két reprezentatív core-t kiszúrva szöveti multiblokkot („tissue microarray” – TMA) készítettünk. Az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archívumából származó máj minták közül 13 eset alkoholos májkárosodásból, 4 eset hepatitis B, míg 13 eset hepatitis C vírus fertőzés talaján kialakult májcirrhotikus esetből származott. A TMA-ból syndecan-1 immunreakciót végeztünk. Az immunreakciók erősségét a Panoramic Viewer programhoz tartozó QuantCenter kiértékelő szoftver DensitoQuant moduljával végeztük.

IV. EREDMÉNYEK

A picrosirius vörös metszeteken az akkumulálódott kötőszövet mennyiségének vizsgálata során a kezelés nélküli csoportokban mind a vad, mind a transzgén egerek esetében az erek körül található kollagénben gazdag szövet. A kezelés hatására mindkét csoportban fokozódott a felhalmozódott kötőszövet mennyisége. Az akkumulálódott kötőszövet kvantitatív meghatározása céljából morfometriai analízist végeztünk, mely a kötőszövet mennyiségének százalékos arányát adja meg a metszeteken. Az eredmények alapján a kezelés második és harmadik hónapjában, a vad csoportban szignifikánsan magasabb volt a felhalmozódott kötőszövet a transzgén csoporthoz képest, míg a különbség kiegyenlítődik a két csoport között.

A kollagén-1 vizsgálata során a fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok során a picrosirius vörös metszetekhez hasonló képet láttunk. A kollagén-1 mRNS szintű változását RT-PCR-al vizsgálva az tapasztalható, hogy a thioacetamid kezelés során a transzgén egerekben szignifikánsan kevesebb a kollagén-1 mRNS mennyisége a vad csoporthoz képest, míg a kezelés negyedik hónapjában a különbség kiegyenlítődik a két csoport között.

A myofibroblastok aktiválódását az SMA mennyiségének változásával követtük nyomon. A kezeletlen állatok májában SMA pozitivitást az erek körül tudunk megfigyelni, míg a thioacetamid kezelés során tapasztalt SMA reakció jól korrelált a kollagén-1 vizsgálatánál tapasztaltakkal. A máj lizátumokból mért SMA mennyisége a vizsgált hónapokban a transzgén egerek esetében sohasem haladta meg a vad típusoknál tapasztalt értékeket.

Az eddigi eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy syndecan-1 jelenléte esetén a kötőszövet csökkent termelődése magyarázza a csökkent kollagén tartalmú kötőszövet akkumulációját a vad csoporthoz képest.

A TGF β 1 a májfibrosis során az egyik legfontosabb mediátor citokin, mely fontos szerepet játszik a HSC sejtek aktivációjában, így megvizsgáltuk a TGF β 1 jelátviteli útvonal aktiválódását. A TGF β 1 és korai válasz génjének, a TIEG-nek, az expresszióját vizsgálva mindkét gén aktiválódását tapasztaltuk a thioacetamid kezelés hatására, azonban a transzgén egerek esetében az mRNS mennyisége több hónapban is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a vad csoporthoz képest. A pSMAD2 és pSMAD3 fehérjék a TGF β 1 kanonizált jelátviteli útvonalának fontos tagjai, melyek mennyiségének vizsgálata során hasonló eltérést tapasztaltunk, a TA kezelés második hónapjában szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen a máj izolátumokban a vad csoportokban a syndecan-1 transzgén egerekhez képest.

A TGF β 1 mellett más az irodalomban leírt, a májfibrosisban fontos szerepet játszó jelátviteli útvonal aktivitását is megvizsgáltuk (pl.: ERK, Akt, GSK, NF κ B és FAK). Mindegyik vizsgált útvonal a thioacetamid kezelés hatására aktiválódott a kezeletlen példányokhoz képest. Az említett jelátviteli útvonalak közül kiemelendő az ERK útvonal, mely a TGF β 1 non-kanonizált útvonala. Az ERK vizsgálata során hasonló eltérést tapasztaltunk a korábbiakhoz. A kezelés első és második hónapjában a vad csoportban szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen a transzgen egerekhez képest.

Következő lépésben meg kívántuk vizsgálni a TGF β 1 hatását in vitro modellben, mely során syndecan-1 transzfektált és kontroll Hep3B és LX2 immortalizált HSC-sejteket használtunk, majd 2 ng/ml TGF β 1 kezelést alkalmaztunk. Azon ko-kultúras modellekben, ahol a médiumban jelentős mennyiségű humán syndecan-1 jelen van a TGF β 1 hatás nem tudott érvényesülni, az SMA és a TIEG expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a nem transzfektált hepatomákkal létrehozott tenyészetekéhez képest.

A fenti eredmények alapján igazolható, hogy a syndecan-1 gátolja többek között a TGF β 1 aktivált jelátviteli utakat, így megvizsgáltuk, hogy a syndecan-1 milyen kapcsolatban áll a TGF β 1 citokinnel.

Rekombináns TGF β 1-et immobilizáltunk PVDF membránra, melyet humán syndecan-1 túltermelő hepatoma sejtek médiumával inkubáltuk. Megfelelő mosási lépések után extracelluláris syndecan-1-el reagáló ellenanyaggal immunreakciót végeztünk. Az immobilizált TGF β 1-nek megfelelő területeken specifikus reakciót látunk, így bebizonyítottuk a syndecan-1 kötődését a TGF β 1-el.

Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a syndecan-1 és a TGF β 1 komplex megjelenhet-e az egerek plazmájában, melyhez ELISA módszert alkalmaztunk. A humán syndecan-1 mennyisége a thioacetamid kezelés hatására szignifikáns növekedést mutat a kezeletlen példányokhoz képest. Az egér TGF β 1 szérum koncentrációja a thioacetamid kezelés hatására a vad példányokban csökkenő tendenciát mutatott, míg a hSDC1 $^{+/+}$ példányokban stabil szintet tapasztaltunk a kezelés során, habár a két csoport közötti különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

Az ELISA eredmények alapján bizonyítottuk, hogy humán syndecan-1 jelenléte esetén az egér TGF β 1-e a perifériás vérben megjelenik, a korábbi eredmények alapján feltehetőleg komplexben kötve.

Megvizsgáltuk az in vivo máj mintáinkban a humán, az egér és az össz syndecan-1 valamint a heparán-szulfát mennyiségének változását. Kezelés nélkül a humán syndecan-1 a hepatocyták basolateralis felszínén jelent meg. A thioacetamid kezelés hatására a human syndecan-1 mennyisége folyamatos csökkenést mutat. Az egér syndecan-1 mennyiségének a

meghatározása érdekében teljes proteoglikán izolátumból végzett egér syndecan-1 Western-blotot végeztünk. A thioacetamid kezelés hatására mindkét csoportban progresszívan megnőtt az egér syndecan-1 mennyisége. A humán syndecan-1 transzgén egerekben az endogén egér syndecan-1 enyhébb emelkedést mutat, amely jelenség háttérében kompenzatorikus folyamatok állhatnak. A syndecan-1 intracelluláris domain-e ellentervezett ellenanyaggal készült Western-bloton vizsgáltuk a májizolátumokban lévő össz syndecan-1 mennyiséget, mely magába foglalja shedding mechanizmusa után a májban maradó syndecan-1 csonkot is. Mind a két csoportban megnő az össz syndecan-1 mennyisége, azonban a transzgén egér törzsekben a syndecan-1 túltermelés miatt minden vizsgált hónapban nagyobb volt a syndecan-1 mennyisége. A proteoglikánok oldalláncokhoz kapcsolódó heparán-szulfát mennyisége a transzgén egerek esetén részben követte a humán syndecan-1 immunreakciónál tapasztaltakat. A kezelés második hónapja után a heparán-szulfát mennyisége folyamatos csökkenést mutat a kísérlet befejezésig. A vad példányok májában a heparán-szulfát mennyisége a második hónapban emelkedik meg, míg a kezelés végére visszacsökken a kiindulási szintre.

A kötőszövet lebontását végző enzimek közül az MMP-2 és MMP-9 enzimek mennyiségét zselatináz reakcióval. Az MMP-2 és -9 a thioacetamid a kezelés hatására mindkét csoportban megnő, azonban az enzimek aktív formájának megjelenése nem volt tapasztalható.

A syndecan-1 sheddingjében részvevő egyik enzim az MMP-14 metalloproteáz mennyiségét is megvizsgáltuk. Hep3B/LX2 és Hep3B SDC1/LX2 ko-kultúrák médiumaiban vizsgáltuk az MMP-14 aktivitását. Az MMP-14 mindkét sejt modell médiumában megjelent, habár a Hep3B/LX2 sejt ko-kultúra esetén kevesebb volt a syndecan-1 túltermelő mintákhoz képest. Míg a Hep3B/LX2 modellben inkább az inaktív forma, addig a Hep3B SDC1/LX2 minták esetén az aktív forma is megfigyelhető, továbbá a syndecan-1 jelenléte MMP-14 mennyiségét megnöveli. Az egér mintákban MMP-14 immunreakcióval vizsgáltuk az enzim megjelenését és változását a kezelése során. Az MMP-14 a thioacetamid kezelés második hónapjában fokozódott a humán syndecan-1-et termelő májokban, a többi csoporttal ellentétben a hSDC1+/+ állatok májában a kezelés második hónapjában nemcsak a sinusoidokban lévő non-parenchymalis sejteken, hanem a hepatocyták plazmamembránjában is megfigyelhető. Ezen eredmények alapján a syndecan-1 fokozza önmaga sheddingjét az MMP-14 termelésén keresztül.

Habár kutató csoportunk korábbi eredményei alapján már tudtuk, hogy a syndecan-1 mennyisége megnő cirrhosis hatására, megvizsgáltuk, hogy a májbetegségek klinikai vonatkozásában tapasztalható-e releváns, a diagnosztika és a terápia szempontjából is hasznos

eltérés. A három leggyakoribb etiológiai faktor alapján nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok között. A MELD-score pontérték emelkedése pozitív tendenciát mutatott a syndecan-1 szintjével, itt a legalacsonyabb és a legmagasabb pontérték közötti különbség szignifikánsnak bizonyult.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

- A humán syndecan-1 termelése véd a fibrogenesis korai fázisában a kötőszövet felhalmozódása ellen.
- A csökkent kötőszöveti felhalmozódás hátterében a csökkent myofibroblast aktivitása és az alacsonyabb kollagén-1 termelés áll.
- A syndecan-1 megköti a TGF β 1-et.
- Mivel a syndecan-1 és a TGF β 1 koncentráció az egerek szérumában párhuzamosan nő, feltételezhető, hogy a szérumban legalább részben egymáshoz kötött formában vannak jelen.
- A transzgén egerek májában a TGF β 1 függő jelátviteli utak a vad csoporthoz képest csökkent aktivitást mutatnak, amit a kötőszövetben lévő relatív TGF β 1 hiány magyarázhat.
- A syndecan-1 autokrin módon a saját „shedding”-jét fokozza az MMP-14 aktiválásán keresztül.
- A vizsgált humán cirrhotikus mintákban a syndecan-1 mennyisége nem mutatott összefüggést a cirrhosis etiológiájával. A humán cirrhotikus mintákban magasabb MELD-score érték esetén szignifikánsan magasabb syndecan-1 mennyiséget igazoltunk.

VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

VI.1. ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. **Regos E**, Abdelfattah HH , Reszegi A , Szilak L , Werling K , Szabo G , Kiss A , Schaff Z , Kovalszky I , Baghy K

Syndecan-1 inhibits early stages of liver fibrogenesis by interfering with TGFbeta1 action and upregulating MMP14.

MATRIX BIOLOGY 68-69:pp. 474-489. (2018) IF:8.136

2. Kiss K ,**Regos E**, Rada K , Firneisz G , Baghy K , Kovalszky I

Chronic Hyperglycaemia Induced Alterations of Hepatic Stellate Cells Differ from the Effect of TGFβ1, and Point toward Metabolic Stress.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 9 p. (2018) IF:1,935

3. **Regos E**, Karaszi K, Reszegi A, Kiss A, Schaff Zs, Baghy K, Kovalszky I
Syndecan-1 in liver diseases

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH accepted article (2019) IF: 1,935

VI.2. EGYÉB TÉMÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. Fullar A , Firneisz G , **Regos E**, Dudas J , Szarvas T , Baghy K , Ramadori G , Kovalszky I

Response of Hepatic Stellate Cells to TGFβ1 Differs from the Response of Myofibroblasts. Decorin Protects against the Action of Growth Factor

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 23:(2) pp. 287-294. (2017) IF: 1,935

2. Baghy K , Tátrai P , **Regös E**, Kovalszky I

Proteoglycans in liver cancer

WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 22:(1) pp. 379-393. (2016) IF: 3,3

3. Baghy K , Horvath Z , **Regos E**, Kiss K , Schaff Z , Iozzo RV , Kovalszky I

Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis.

FEBS JOURNAL 280:(10) pp. 2150-2164. (2013) IF: 3,986