

# A decorin terápia felhasználhatóságának vizsgálata primer és metasztatikus májdaganatokban

Doktori értekezés

**Reszegi Andrea**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Baghy Kornélia, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Tordai Attila, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Pápai Zsuzsanna, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

## 1. BEVEZETÉS

A hepatocelluláris carcinoma (HCC) világszerte a negyedik, a colorectalis carcinoma (CRC) pedig a második leggyakoribb rosszindulatú daganat. Arról, hogy a decorin milyen szerepet tölt be ezekben a daganatokban, csak kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre.

A decorin az extracelluláris mátrix kis leucinban gazdag proteoglikánja, melyet elsődlegesen csillagsejtek, simaizomsejtek és aktivált vasculáris endothelialis sejtek termelnek. Az ép szövetekben kollagénhez kötődve van jelen, azokat dekorálja, innen kapta a nevét is. A decorin fontos szerepet tölt be a kollagén fibrillogenesisében, képes kötődni az ínokban, bőrben, ligamentumokban, és egyéb kötőszövetben előforduló I, II, IV. típusú kollagénekhez. A kollagén rostok közötti távolság a fehérje vázához kapcsolódó kondroitin- vagy dermatán-szulfát oldalláncok által szabályozott. A fibrillogenesis mellett, a decorin részt vesz a kollagén „turnover” és degradáció szabályozásában is.

A kötőszövet szerkezeti biztosításán túl, a decorin számos más élettani folyamat szabályozásában is részt vesz, ilyenek a differenciáció, migráció, proliferáció, adhézió, továbbá fontos szerepet tölt be a gyulladásra bekövetkező válaszreakció kialakításában és a tumor növekedés szabályozásában is. Ez utóbbit három szinten képes befolyásolni: a decorin közvetlen hatással van egyes primer tumorok növekedésére és progressziójára, szerepe van az angiogenesis szabályozásában, illetve gátolja a metasztázisok kialakulását.

A decorin a daganatok körül is kimutatható, az úgynevezett daganatos mikro környezetben. Hatásosan gátolja a tumorsejtek növekedését és migrációját egyrészt azzal, hogy a transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF- $\beta$ 1) gátlásával szabályozza a tumoros stróma képződését, másrészt közvetlenül befolyásolja a daganatsejtek jelátviteli folyamatait. A decorin képes közvetlenül kötődni a TGF- $\beta$ 1-hez, majd kölcsönhatása révén hatékonyan gátolja a tumorsejtek növekedését és terjedését.

A decorin tumorszupresszor hatását elsőként különféle receptor tirozin kinázok (RTK) gátlásával hozták összefüggésbe. A decorin első tanulmányozott RTK interakciós partnere, az ErbB család tagjaként

ismert epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) volt. Az interakció által elindított útvonal eredményeként mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) aktiválódnak, intracelluláris kalcium mobilizálódik, és a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ciklin-dependens kináz inhibitor indukciója következik be, valamint a kaszpáz-3 aktiválása. Mindezek hatására a sejtproliferáció gátlás alá kerül, apoptózis, angiogenesis és onkogén szuppresszió következik be a sejtekben. A decorin ezen kívül fokozza az EGFR caveola-mediált endocitózisát és lizoszómális degradációját, mely csökkenti a membránban található receptor mennyiségét. A fokozott decorin expresszió csökkenti az EGFR aktivitását, ami p53 és p21<sup>WAF1/CIP1</sup> fehérjék indukciójához vezet. Ennek hatására a sejtek a ciklus G1 fázisában megrekednek, a sejtproliferáció gátlás alá kerül. Az EGFR mellett a decorin ismert ligandja a hepatocyta növekedési faktor (HGF) receptorának a Met-nek, az inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptornak (IGF-1R) és a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptornak (PDGFR).

A tirozin kináz receptorok mesterséges vegyületekkel való gátlása a mai kemoterápiás kezelések integráns része. A májrákok kezelésére jelenleg használt első vonalbeli készítmény a Sorafenib (Nexavar) egy VEGFR (vascularis endothelialis növekedési faktor receptor), PDGFR, valamint Raf kináz gátló molekula, továbbá a Lenvatinib (Lenvima), melynek további célpontja a fibroblast növekedési faktor receptor (FGFR). A fent említett receptorok mindegyike célpontja a decorinnak is, sőt a decorin a májrákok kialakulásában kiemelt jelentőségű Met és EGFR receptorokat is gátolja, melyre a Sorafenib és Lenvatinib nem alkalmas.

Vastagbél-daganatban szenvedő betegek részére számos hatékony kezelési lehetőség létezik, ilyen a műtét, sugárterápia, kemoterápia, immunterápia és a célzott terápia. A vastagbélrák esetében már elfogadottá vált bizonyos molekuláris események, elsősorban az EGFR tirozin kináz receptor által indukált jelátviteli út célzott gátlása. A legismertebb jelenleg forgalomban lévő EGFR-gátlók a Cetuximab (Erbix) és a Panitumumab (Vectibix). A decorinról ismert, hogy

hatékonyan gátolja nemcsak az EGFR, hanem a VEGFR, PDGFR, Met és Raf kinázok aktivitását is, így a decorin terápiás célú felhasználásának lehetősége akár önmagában vagy adjuvánsként nem megalapozatlan.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai kimutatták, hogy a decorin génkiütött (DCN<sup>-/-</sup>) egerekben a fibrogenesis mellett a hepatocarcinogenesis is fokozott. Ebben a kísérleti rendszerben a DCN<sup>-/-</sup> és vad típusú állatokat kétféle hepatocarcinogénnel, tioacetamiddal (TAA), illetve dietil-nitrozaminnal (DEN) kezelték. A DCN<sup>-/-</sup> egerekben a HCC kialakulása mindkét kísérleti rendszerben fokozott volt a vad típusú csoporthoz képest. A tumorok térfogatát összehasonlítva azt láthatjuk, hogy a TAA-dal kezelt állatokban kb. ötször nagyobb tumorok alakultak ki, mint a DEN-nel kezelt egerek májában.

A leírt állatkísérletes eredményekre alapozva munkám során a decorin, mint RTK gátló terápiás felhasználhatóságának lehetőségeit vizsgáltam primer HCC-ban és colon adenocarcinoma májmetasztázisaiban, mind *in vitro*, *in silico*, humán mintákon és állatkísérletes körülmények között.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Hipotézisünk szerint a decorin, mint fiziológias tirozin kináz receptor inhibitor, számos daganat proliferációjának hatékony gátlószere lehet. A korábbi állatkísérletes eredményekre alapozva, munkám célja a decorin szerepének, valamint molekuláris hátterének tanulmányozása hepatocelluláris carcinómában és colon adenocarcinoma májmetasztázisaiban.

Feltételezéseinket három szinten történő vizsgálatokkal terveztük bizonyítani:

- Humán HCC, valamint colon adnocarcinoma májmetasztázis szöveti microarray vizsgálatokat terveztünk, melyben a decorin, az  $\alpha$ -simaizom actin és az EGFR fehérje, illetve mRNS szintű változásait tanulmányoztuk.
- *In vitro* olyan kísérletes rendszert terveztünk, melyben LX2 humán csillagsejt vonalat különféle (HLE, HepG2, Hep3B, HuH7) hepatoma, valamint colon adenocarcinoma (HT29) sejtek kondicionált médiumában növesztettük. Vizsgáltuk a különféle tumor sejtvonalak csillagsejtek (LX2) decorin termelésére adott változásait.
- Olyan *in vivo* modellt rendszert hoztunk létre, melyben a decorin túltermelő májban (decorin expressziós vektor bejuttatásával) vizsgáltuk a primer hepatocarcinogenesis folyamatát, valamint a c38 egér colorectális carcinoma sejtvonala kolonizációját a májban.

Kutatásaim további céljai között szerepelt a fent bemutatott kísérleti rendszerek molekuláris hátterének feltérképezése, a résztvevő molekulák mennyiségi és minőségi változásainak kimutatása, valamint átfogó képet kapni a decorin szerepéről primer és metastatikus májdaganatokban.

### 3. MÓDSZEREK

**Az *in silico* vizsgálataink** során az online elérhető ArrayExpress adatbázis, E-MTAB-950 kísérleti adatait használtuk fel. Az adatbázisban összesen 112 HCC eset géneexpressziós értékei találhatóak, valamint 10 olyan minta is elérhető, amely ugyanazon HCC-s beteg tumoros és nem tumoros környező májszövet adatait tartalmazza. Kontrollként 36 normál minta található. A vizsgált HCC esetek etiológiája: HBV és HCV fertőzés. Az adatbázisból a decorin és az  $\alpha$ -simaizom actin (SMA) expressziós értékeit elemeztük és értékeltük R-programozási nyelv segítségével. A decorin géneexpressziós értékeit az SMA mRNS mennyiségekre vonatkoztattuk, ezzel kiküszöbölve a decorin termelő csillagsejtek számának eltéréséből adódó decorin mennyiségi változásokat. Az SMA jól tükrözi az aktivált csillagsejtek számát, melyek a decorin termelésének fő forrásai.

**A humán HCC esetek szöveti microarray (TMA)** blokk összeállításához 37 db paraffinba ágyazott mintát gyűjtöttünk össze, ebből 19 cirrhosis talaján kialakult HCC, 9 db pedig nem cirrhotikus májban kialakult HCC volt. Kontrollnak 9 db haemangioma melletti ép májszövetet használtunk. A TMA blokkok HCC mintái minden beteg esetén tartalmazta a tumor stromát és tumor körüli részt külön-külön core-okban. A blokkokat metszettük, majd hematoxilin-eozin festést, továbbá decorin, SMA és EGFR **immunhisztokémiai reakciókat** végeztünk rajtuk, valamint vizsgáltuk a fenti targetek mRNS szintű változásait **Real Time Q-PCR** segítségével. A TMA lemezen végzett immunhisztokémiai reakció kiértékelését két egymástól független patológus végezte Panoramic Viewer szoftver használatával.

**A humán colon adenocarcinoma májmetasztázis TMA** blokk összeállításához 30 db humán FFPE mintát használtunk, mely minden beteg esetén külön-külön core-okban tartalmazta mind a normál colon, primer tumor, májmetasztázis és metasztázis körüli nem tumoros szövetet. A blokkokat metszettük, majd hematoxilin-eozin festést, illetve decorin és SMA **immunhisztokémiai reakciókat** végeztünk rajtuk. Az eredmények kiértékelését a fentiekben már ismertetett módon végeztük.

***In vitro* vizsgálataink során** a HCC vizsgálatokban négy különböző humán hepatoma sejtvonal kondicionált médiumával (HuH7, HLE, HepG2, Hep3B) dolgoztunk, colon adenocarcinoma vizsgálatokhoz pedig, HT29 humán colon adenocarcinoma sejtek kondicionált tápfolyadékát használtuk. Mindkét kísérlet esetén az LX2 humán máj csillagsejt vonalat használtuk a csillagsejt-tumorsejt-decorin interakció vizsgálatára.

***In vivo* kísérleteink során** a decorin pLIVE vektorba klónozását követően, hidrodinamikusan génbevitel módszerével juttattuk be a C57Bl/6 egerekbe. TAA segítségével hepatocarcinogenesis modellt, valamint egér c38 colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltásával kolonizációs modell-rendszert hoztunk létre. Az állatkísérletekből származó mintákat a továbbiakban molekuláris vizsgálatokhoz használtuk fel.

**Fehérje kimutatási módszerek:** A foszfo-kináz és a foszfo-tirozin kináz receptorok aktivitás méréséhez Proteome Profiler Phospho-Kinase Array Kit-et, valamint Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array Kit-et használtunk a gyártók utasításai alapján. Fehérje mennyiségi összehasonlító vizsgálatokhoz **Western blot és dot blot** technikákat alkalmaztunk. A vizsgált targetmolekulák: *decorin*, *símaizom aktin*, *EGFR*, *pEGFR (Tyr1068)*, *pIGF-1R (Y1161)*, *pAkt (Thr308)*, *pAkt (S473)*, *pERK1/2* és  *$\beta$ -aktin*. A humán decorin mennyiségét az egerek szérumból **ELISA vizsgálattal** határoztuk meg, Human Decorin ELISA Kit segítségével.

**A statisztikai vizsgálatokat** kísérleteink során minden esetben legalább három, egymástól független biológiai párhuzamost végeztünk. A statisztikai elemzéseket Graphpad Prism 4.03 szoftver segítségével készítettük. Az adatok normál eloszlását a D'Agostino & Pearson omnibus teszt segítségével határoztuk meg. A csoportok közti változásokat az adatok eloszlásától függően nem parametrikus (Mann-Whitney) vagy Student-féle t-tesztel vizsgáltuk. Szignifikáns értékeknek a \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  határoztuk meg.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **HCC vizsgálatok**

#### ***In silico humán HCC vizsgálatok***

Az ArrayExpress adatbázis E-MTAB-950 kísérleti adataiból nyert vizsgálatok alapján a HCC-ban szignifikánsan csökkent a decorin mRNS expressziója a normál máj mintákhoz, valamint a tumort környező szövethez képest. A decorin SMA-ra vonatkoztatott relatív expressziója szignifikánsan csökkent a tumor mintákban, az ép májhoz és a tumort környező szövethez képest. Számításaink kimutatták, hogy ez a különbség nem függ az aktivált csillagsejtek számától, ugyanis a decorin abszolút értéke és az SMA-ra vonatkoztatott relatív mennyisége egyaránt hasonló változást mutatott.

Vizsgáltuk azt is, hogy az adatbázisban fellelhető patológiai, klinikai adatok tükrében, hogyan változnak az általunk meghatározott DCN/SMA expressziós értékek. A HCC-k tekintetében azt láttuk, hogy minél előrehaladottabb a betegség, annál alacsonyabb volt a relatív decorin mRNS szintje. Az eltérés a nagyon korai HCC-k esetében még nem, de a korai, előrehaladott és nagyon előrehaladott stádiumok esetében szignifikánsnak bizonyult. Vizsgáltuk a decorin viszonyát a barcelonai stádiumbeosztás összefüggésében is. A proteoglikán relatív expressziója a stádium előrehaladottságával szignifikánsan csökkent az ép májmintához viszonyítva.

#### ***Humán HCC TMA eredmények***

*In silico* vizsgálatainkat követően, kíváncsiak voltunk a DCN/SMA fehérjeszintű változásaira humán HCC esetekben.

Normál körülmények között, az ép májszövetben a csillagsejtek alacsony mátrixfehérje termelő aktivitással rendelkeznek. Az ép májban a decorin kis mennyiségben a periportális kötőszövetben, és a centrális vénák fala körül mutatható ki. A cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult HCC-ban peritumorálisan az aktivált csillagsejtek száma megnő elsősorban a kötőszövetes septumok mentén, ami SMA festéssel jól



látható. A tumor körüli szövetben, akár cirrhotikus, akár nem cirrhotikus HCC minták esetén, magas SMA intenzitást, valamint ezzel együtt magas decorin expressziót detektáltunk. Összehasonlítva az ugyanazon májból származó tumoros és környező szöveti mintákat, azt láthatjuk, hogy mind a cirrhotikus, mind pedig nem cirrhotikus májban kialakult HCC esetében a tumorban és a környező szövetben bár a csillagsejtek nagy számban jelen vannak, de a tumorban a decorin jelintenzitása gyenge, expressziója szignifikánsan alacsonyabb, mint a környező szövetben. Összhangban a fehérje szintű vizsgálattal, hasonló tendenciát figyelhetünk meg mRNS szinten is. Mindez arra enged következtetni, hogy a gátlás már transzkripciós szinten megtörténik.

Az egyes minták decorin és az SMA jelintenzitását 12-es pontrendszer használatával csoportosítottuk: decorint nem expresszáló (score-érték: 0), decorint alacsony mértékben expresszáló (score-érték: 1-6), decorint magasan expresszáló (score érték: 7-12) HCC. Összevetve a cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult tumoros eseteket, a minták több mint felében negatív decorin expressziót azonosítottunk (52%), 33%-ban volt kismértékű decorin intenzitás és az esetek csupán 15%-a mutatott magas proteoglikán intenzitást.

Ezt követően kíváncsiak voltunk, hogy az EGFR, mint a decorin egyik potenciális célpontja milyen expressziót mutat a humán HCC eseteinkben. Az immunvizsgálatok alapján azt látjuk, hogy a decorin az EGFR szintjével ellentétesen mozog. Az EGFR megoszlását vizsgálva magas expressziót detektáltunk a tumorban, ezzel szemben a nem tumoros környező szövetben intenzitása minimális volt. Ugyanezen szöveti mintán a decorin megoszlását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a tumorban jelintenzitása alacsony, valamint annak strómájában is minimális volt, szemben a nem tumoros környező szövettel, ahol a kötőszövetben abundáns decorin expressziót mértünk.

### ***In vitro kísérleti rendszer***

Az *in silico*, illetve a TMA megfigyeléseink alapján arra következtettünk, hogy a tumorban a decorin expresszió csökkenése nem

a csillagsejtek számának különbségéből ered. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a daganatsejtek közvetlenül fejtik-e ki a gátló hatásukat a csillagsejtek decorin termelésére. Az LX2 sejtek decorin termelése csökkent a HepG2, HuH7, HLE és Hep3B humán hepatoma sejtvonalak kondicionált médiumának jelenlétében. A proteoglikán mRNS expressziójában szintén csökkenést figyelhettünk meg a 4 sejtvonala esetén. Ezek az eredmények jól korrelálnak a humán HCC mintákon kapott megfigyeléseinkkel, jelezve, hogy a tumorsejtek gátolják a decorin expresszióját, és a decorin tumorszuppresszor hatására utalnak.

### ***In vivo primer hepatocarcinogenesis modell***

Korábbi kísérleteinkre alapozva, olyan *in vivo* modell rendszert hoztunk létre, melyben a decorint túltermelő egerek májban vizsgáltuk a primer hepatocarcinogenesis folyamatát. *In vivo* munkánk során az egerekből kétféle csoportot hoztunk létre: a pLIVE-üres vektorral transzfektált: kontroll (pLIVE-SEAP+pLIVE-0), valamint a pLIVE-decorin plazmiddal transzfektált: kezelt (pLIVE-SEAP+pLIVE-DCN) csoportot. A plazmidot farokvénán keresztül hidrodinamikus génbetitel módszerével juttattuk az egerek keringésébe, mely a hidrodinamikus körülményeknek, valamint a pLIVE vektor sajátosságainak köszönhetően, hosszú időn keresztül, magas szintű expressziót biztosított az egerek májában.

Fluoreszcens festéssel megvizsgáltuk a transzfeccióval bejuttatott humán decorin lokalizációját, mely a centrális vénák körüli hepatocyták citoplazmájában van jelen.

A bejuttatott pLIVE-SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) kontroll vektorként szolgált, mely közvetett információt szolgáltat a transzfecció sikerességéről, ugyanis az általa kifejeződő alkalikus foszfatáz, kemilumineszcens assay segítségével egyszerűen detektálható az állatok véréből. Vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy a transzfecció sikeres volt, a SEAP vektor aktivitása magas expressziót mutatott az állatok többségében. A decorinnal transzfektált állatok csoportjait, három alcsoportra osztottuk a SEAP aktivitásuk

alapján. Megkülönböztettünk decorin negatív, alacsony decorin expressziós, és a proteoglikánt magas aktivitással expresszáló csoportokat.

TAA kezelés hatására a legtöbb daganatot azoknál az állatoknál figyelhettünk meg, melyek májában nem fejeződött ki az humán decorin. Ugyanakkor a decorin expresszáló csoportokban a tumorszám jelentősen csökkent (72%, 78%), függetlenül attól, hogy milyen mértékben fejeződött ki a proteoglikán. A decorin expresszáló csoportok alacsonyabb máj-/testtömeg-arányai is alátámasztják a decorin jótékony hatását. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a decorin génbevitel gátolja a HCC kialakulását, mutatva, hogy a proteoglikán szolubilis formában tumorszuppresszorként működhet.

Kísérleti rendszerünkben megfigyeltük, hogy a decorin (pLIVE-DCN) transzfekciót követően, a TAA kezelt egerekben szignifikánsan csökkent az EGFR, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , PDGFR/Flt-3, PDGFR/SCF, AXL, HGF/MSPR, MuSK és az Inzulin receptor aktivitása a pLIVE-0 csoporthoz képest. TAA kezelt állatokban párhuzamosan a RTK-ok aktivációs állapotának csökkenésével, 12%-os ERK1/2 aktivitás csökkenést figyeltünk meg a kontroll csoportokhoz képest. A foszforilált IGF-1R expressziója nem változott a karcinogén hatására a pLIVE-0 állatokban. Azonban, ugyanezen RTK aktivitása 2x emelkedést mutatott a TAA kezelt, decorin overexpresszált csoportokban. Kíváncsiak voltunk, hogy az Akt, mint az IGF-1R receptor ismert downstream effektorának aktivitása hogyan változik a mi kísérleti rendszerünkben. A pAkt (T308) változása követi az IGFR-ét, 35%-os emelkedést mértünk a pLIVE-DCN transzfektált, TAA kezelt egerek csoportjaiban, a pLIVE-0 mintákhoz képest. Az Akt megnövekedett aktivitása révén az mTOR útvonal is fokozódott, melyre a foszfo-p70S6K fehérjék emelkedett mennyisége utal. Továbbá, a GSK3 és WNK1 foszfo-fehérjék magasabb szintje szintén az Akt aktivitás következménye. Ehhez kapcsolódóan, a PDK1 által foszforilált RSK1/2/3 fehérjék mennyisége 30%-kal emelkedett. Az RSK kináz aktivitásának köszönhetően a foszfo-p27KIP1 ciklin dependens kináz inhibitor mennyisége szignifikáns emelkedést

mutatott decorin transzfekció hatására a TAA kezelt állatokban: 48%-os emelkedést tapasztaltunk, a pLIVE-0 csoporthoz képest. A megnövekedett PLC $\gamma$  és PYK2 szintén a fokozott RTK aktivitásra utal. TAA kezelés esetén a foszfo-p53(S392), a foszfo-p53(S46) és a foszfo-p53(S15) fehérjék expressziója 2x, 1,6x-os és 1,7-es emelkedést mutattak a decorin kezelés hatására a pLIVE-0 májakkal szemben. A p53 magasabb szintje arra utal, hogy a decorin a sejtciklust a G1 fázisban megállítja.

Összességében, a fentiekben kiemelt célpontok a decorin daganatgátló hatását erősítik, tehát bátran mondhatjuk, hogy a decorin, mint más daganatokban, a májban is tumorszuppresszorként viselkedik.

## **Colon adenocarcinoma májmetasztázis vizsgálatok**

### ***Humán colon adenocarcinoma májmetasztázis TMA eredmények***

A humán TMA vizsgálataink alapján a legmagasabb decorin expresszió az ép vastagbél nyálkahártyában volt. A primer tumorban jelentős mennyiségű proteoglikán felhalmazódást láthatunk, de expressziója alacsonyabb az ép vastagbél nyálkahártyában mért értékeknél. Az immunfestés azt mutatta, hogy ugyanazon beteg májmetasztázisában a decorin expresszió szignifikánsan alacsonyabb, mint a primer tumorban. Nincs szignifikáns különbség a tumort környező májszövet és a májmetasztázis decorin expressziója között.

Vizsgáltuk a decorin változásait a „replacement” és „desmoplasticus” növekedési mintázat esetén is. A decorin intenzitása alacsonyabb az agresszívebb, „replacement” típusú metasztázisokban, mint a „desmoplasticus”-ban. Vizsgálataink alapján a Grade III. daganatok májmetasztázisaiban alacsonyabb decorin expressziót mértünk, mint a Grade II.-ben. A Grade III. májmetasztázisok decorin intenzitása alacsonyabb a primer tumor párjaiban mért értékhez képest, mint a Grade II stádiumú primer-metasztázis tumor párokban. Korrelációs analízisünk alapján, mind a primer CRC esetében, mind pedig a májmetasztázis mintákban a decorin mennyisége nincs összefüggésben az SMA

mennyiségével. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a decorin mennyisége és a daganat agresszivitása között összefüggés lehet.

### ***In vitro metasztázis vizsgálatok***

A májmetasztázis TMA vizsgálatait, illetve a humán HCC vizsgálati eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a daganat progressziója során a decorin expressziója folyamatosan csökken. Ennek bizonyítására, már a HCC vizsgálatoknál ismertetett módon jártunk el. Szignifikánsan kevesebb decorin mennyiséget mértünk az LX2 csillagsejtek médiumában, amikor azok HT29 colon adenocarcinoma sejtvonal kondicionált tápfolyadékának jelenlétében növekedtek, továbbá a csökkenést mRNS szinten is detektáltuk. Ezek az eredmények jól korrelálnak a korábbi vizsgálatainkkal, melyek a decorin tumorszupresszor szerepét erősítik.

### ***In vivo kolonizációs modell***

A májmetasztázis vizsgálatokhoz olyan kolonizációs modellt hoztunk létre, melyben a decorint túltermelő egerek májában, c38 egér colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően vizsgáltuk a tumor megjelenését és annak molekuláris hátterét.

A hidrodinamikus génbevétel sikerességét immunhisztokémiai festéssel, valamint humán decorin ELISA-val erősítettük meg. A hidrodinamikus génbevétel hatására a decorint nem expresszáló csoportokban szignifikánsan több tumorgócot detektáltunk, mint a proteoglikánnal transzfektált csoportban c38 egér colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően. A decorinnal kezelt egerek esetében 63%-kal csökkent a tumor prevalenciája a kontroll csoporthoz képest, melyet az alacsonyabb máj-/testtömegarány is alátámaszt. Ezek alapján bátran feltételezhetjük a decorin védő hatását a metasztatikus májdaganatokkal szemben is.

A továbbiakban célul tűztük ki a decorin transzfekció hatására bekövetkező daganat-specifikus jelátviteli utak tanulmányozását. A proteoglikánt overexpresszáló, c38 colorectális carcinoma sejttel oltott

csoportokban az EGFR, PDGFR $\alpha$  és a HGF/MSPR receptorok aktivitásában 43%, 45% és 63%-os csökkenést figyelhettünk meg a kontrollhoz képest. Ezzel párhuzamosan, a c38 sejtekkel oltott egerekben az ERK1/2 aktivitása 22% és 27%-kal csökkent, szemben az üres vektorral transzfektált csoporttal. A decorin transzfektált, c38 CRC sejtekkel oltott csoportokban, a gátolt RTK-ok mellett, csökkent Ras/MAPK (csökkent ERK1/2, RSK1/2-vel jelölve) és csökkent PLC $\gamma$ -t detektáltunk, a kontroll (pLIVE-0) csoportokkal összehasonlítva. Ezenkívül, a fokozott proteoglikán termelés gátolta az Akt/mTOR útvonal működését, amelyet az alacsonyabb pAkt (T308) és a foszfo-p70S6K szint jelzett. A csökkent Akt aktivitás mellett a pLIVE-DCN csoportban a WNK1 fehérje alulszabályozását is kimutattuk, továbbá a STAT fehérjék, illetve a c-Jun szintje szintén alacsonyabb volt a pLIVE-0 mintákkal szemben. Eredményeink szerint csökkent a  $\beta$ -catenin aktivitása is, ami a CRC fontos jelátviteli fehérjéje, illetve a decorin ismert célpontja.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a decorin védő szerepet játszik a colon adenocarcinoma májmetasztázisaival szemben, valamint kísérletes rendszerünkben is a RTK-ok gátlásán keresztül fejti ki hatását.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

A hepatocelluláris carcinoma (HCC) világszerte a negyedik, a colorectális carcinoma (CRC) pedig a második leggyakoribb rosszindulatú daganat. A decorin az ECM kis leucinban-gazdag proteoglikánja, mely a daganatok körül, a daganatos mikrokörnyezetben is kimutatható. Munkacsoportunk korábbi tanulmányai szerint a decorin génhiányos egerekben fokozott fibrogenesis mellett, fokozott hepatocarcinogenesis volt megfigyelhető. További megfigyelések szerint különböző daganattípusokban csökkent vagy teljesen blokkolt decorin expressziót mérhetünk, ami azt sugallja, hogy a proteoglikán hiánya túlélési előnyt biztosít a tumorsejtek számára. A decorin terápiás szerként történő alkalmazásnak lehetőségét számos irodalmi adat támasztja alá, ugyanis különböző kísérleti modellben hatékonyan gátolja a tumor kialakulását, progresszióját, az angiogenezist és a daganatok áttétképződését is. Munkám során célul tűztem ki a proteoglikán szerepének vizsgálatát HCC-ban és colon adenocarcinoma májmetasztázisában. Humán TMA vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a decorin mennyisége a legtöbb HCC esetében szignifikánsan csökkent a tumort környező szövetéhez és az ép májhoz képest. A csökkenés mértéke összhangban volt a HCC előrehaladottságával. A humán CRC májmetasztázis vizsgálataink hasonló eredményeket mutattak, csökkent decorin mennyiség volt mérhető a májmetasztázis mintákban, szemben a primer daganatokkal. Mindemelett, csökkent decorin volt mérhető a „replacement” típusú metasztázisokban, mint a „desmoplasticus”-ban, valamint Grade III. daganatok májmetasztázisaiban, összehasonlítva a Grade II.-vel. Mindezek arra engednek következtetni, hogy összefüggés lehet a decorin mennyisége és a daganat agresszivitása között. *In vitro* kísérleteink során a hepatoma, illetve a colon adenocarcinoma sejtvonalak kondicionált médiuma gátolta az LX2 csillagsejtek decorin termelését. *In vivo* modellünkben a hidrodinamikus génbevittel bejutatott decorin gátolta a heptaocarcinogenesis és a colon adenocarcinoma májáttéteinek kialakulását. A decorin tumorszupresszor szerepét különböző RTK

gátlásán keresztül érte el. Az EGFR fehérje gátlásával párhuzamosan csökkent a MAPK/ERK aktivitása. A fokozott AMPK (valószínűleg LKB1 útján), valamint p38/MSK/CREB jelátviteli utak megnövekedett foszfo-p53 szintet eredményeztek, aminek hatására a sejtciklus gátlódott.

Az irodalmi adatok alapján a decorin hatásos tirozin kináz receptor gátló, így joggal merül fel a kérdés, vajon használható-e a decorin mint fiziológiás RTK gátló a máj daganatos megbetegedéseiben. *In silico*, *in vitro* és *in vivo* kísérleteink, valamint humán biopsziás mintákon történő vizsgálataink válasszal szolgálnak arra, hogy a decorin védő szereppel bír primer HCC-ban és CRC májmetasztázisában. Emellett a decorin a szervezetben természetesen is előforduló molekula, mely mennyisége megfigyeléseink alapján a májdaganatok körül felszaporodik, így feltehetően a test természetes védekező mechanizmusának része.

Összefoglalva, a decorin, mint „az ECM aktív harcosa” felbecsülhetetlen értékű „fegyver” lehet a primer és metasztatikus májdaganatok elleni küzdelemben.

*Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatók le:*

**1. A proteoglikán hiánya túlélési előnyt biztosít a tumorszövet számára.**

- a. *In silico* vizsgálataink során a HCC minták tumor strómájában szignifikánsan kevesebb relatív decorin mRNS expresszió volt mérhető, szemben az ugyanazon minta tumort környező szövetével, valamint a kontroll mintával.
- b. A HCC stádium előrehaladottságával a proteoglikán relatív expressziója szignifikánsan csökkent.
- c. Csökkent relatív DCN/SMA expressziót mértünk fehérje és RNS szinten a humán HCC mintákban, összehasonlítva ugyanazon beteg nem tumoros környező májszövetével.
- d. Humán HCC esetekből készített szöveti szöveti microarrayk vizsgálatával megállapítottuk, hogy a mintáink 52%-ban negatív, 33%-ban pedig alacsony a decorin expresszió, és csupán a minták 15%-ában mértünk magas decorin immunpozitivitást.



- e. Humán colon adenocarcinoma májáltéteiben szignifikánsan csökkent a decorin expresszió, azok primer tumoraikhoz képest, emellett csökkent decorint mértünk az agresszívebb „replacement” növekedési mintázatú májmetasztázisokban, a „desmoplasticus”-sal szemben. Kevesebb decorin volt a Grade III. típusú májmetasztázisokban és azok primer tumoraiban, a Grade II.-höz képest, mindezek felvetik a lehetőségét a decorin mennyisége és a tumor agresszivitása közötti összefüggésnek.
- f. Szignifikánsan kevesebb decorin volt mérhető az LX2 sejtek médiumában, amikor HLE, HepG2, HuH7 hepatoma sejtek, valamint HT29 colon adenocarcinoma sejtek kondicionált médiumában növesztettük őket.

**2. A decorin *in vivo* védelmet nyújt a tumorképződéssel szemben, ezt támasztják alá mind a hepatocarcinogenesis vizsgálataink, mind pedig a kolonizációs modellünk is.**

- a. *In vivo* hepatocarcinogenezis modellünkben, a decorin számos RTK aktivitását gátolta, melyet csökkent MAPK/ERK működés jellemezett. Ezzel szemben az IGF-1R indukcióját figyeltük meg, melyhez fokozott Akt/mTOR aktivitás társult. A gátolt tumorigenesisért feltételezhetően az emelkedett foszfo-p53 szint tehető felelőssé.
- b. *In vivo* kolonizációs modellünkben a decorin tumorgátló hatását a RTK-ok gátlásán keresztül fejtette ki, ezzel párhuzamosan csökkent a MAPK/ERK és az Akt/mTOR/p70S6K utak aktivitása. A fokozott AMPK (valószínűleg LKB1 útján), valamint p38/MSK/CREB jelátviteli utak megnövekedett foszfo-p53 szintet eredményeztek, aminek hatására a sejtciklus blokádnál került.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1. **Reszegi, A.**, Horváth, Z., Fehér, H., Wichmann, B., Tátrai, P., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2020). Protective Role of Decorin in Primary Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in oncology*, *10*, 645. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00645>  
IF: 4.848 (2019)
2. **Reszegi, A.**, Horváth, Z., Karászi, K., Regős, E., Postniková, V., Tátrai, P., Kiss, A., Schaff, Z., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2020). The Protective Role of Decorin in Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Biomolecules*, *10*(8), E1199. <https://doi.org/10.3390/biom10081199>  
IF: 4.082
3. Horváth, Z., **Reszegi, A.**, Szilák, L., Dankó, T., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2019). Tumor-specific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *Cellular signalling*, *62*, 109354. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109354>  
IF: 3.968 (2019)

Össz IF=12,898

### Könyvfejezet:

4. Baghy, K., **Reszegi, A.**, Tátrai, P., & Kovalszky, I. (2020). Decorin in the Tumor Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, *1272*, 17–38. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-48457-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48457-6_2)
5. Sevic, I., Spinelli, F. M., Cantero, M. J., **Reszegi, A.**, Kovalszky, I., García, M. G., & Alaniz, L. (2019). The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In J. Tirnitz-Parker (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma*. Codon Publications.

### **A disszertációtól független saját közlemények**

6. Fullár, A., Karászi, K., Hollósi, P., Lendvai, G., Oláh, L., **Reszegi, A.**, Papp, Z., Sobel, G., Dudás, J., & Kovalszky, I. (2020). Two ways of epigenetic silencing of TFPI2 in cervical cancer. *PLoS one*, 15(6), e0234873.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234873>  
IF: 2.740 (2019)
  7. Regős, E., Karászi, K., **Reszegi, A.**, Kiss, A., Schaff, Z., Baghy, K., & Kovalszky, I. (2020). Syndecan-1 in Liver Diseases. *Pathology oncology research: POR*, 26(2), 813–819.  
<https://doi.org/10.1007/s12253-019-00617-0>  
IF: 2.826 (2019)
  8. Mervai, Z., **Reszegi, A.**, Miklya, I., Knoll, J., Schaff, Z., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2020). Inhibitory Effect of (2R)-1-(1-Benzofuran-2-yl)-N-propylpentan-2-amine on Lung Adenocarcinoma. *Pathology oncology research: POR*, 26(2), 727–734.  
<https://doi.org/10.1007/s12253-019-00603-6>  
IF: 2.826 (2019)
  9. Mihály, D., Papp, G., Mervai, Z., **Reszegi, A.**, Tátrai, P., Szalóki, G., Sági, J., & Sági, Z. (2018). The oncomir face of microRNA-206: A permanent miR-206 transfection study. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 243(12), 1014–1023.  
<https://doi.org/10.1177/1535370218795406>  
IF: 3.005 (2018)
  10. Regős, E., Abdelfattah, H. H., **Reszegi, A.**, Szilák, L., Werling, K., Szabó, G., Kiss, A., Schaff, Z., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2018). Syndecan-1 inhibits early stages of liver fibrogenesis by interfering with TGFβ1 action and upregulating MMP14. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 68-69, 474–489. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.008>  
IF: 6.986 (2018)
- Össz. IF= 31.281

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni lehetőséget, hogy köszönetemet, tiszteletemet fejezzem ki mindazoknak, akik hozzájárultak a doktori munkám elkészüléséhez.

Szeretnék külön köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Baghy Kornéliának**, aki szakértelmével, nélkülözhetetlen tanácsaival hatalmas segítséget nyújtott munkám elkészüléséhez, ötleteiből, tudományos tapasztalataiból, gyors és logikus lényeglátásából rengeteget tanulhattam. Külön hálám szeretném kifejezni, a felbecsülhetetlen értékű szakmai és emberi segítségéért, **Prof. Dr. Kovalszky Ilonának**, aki PhD képzésem során mindvégig támogatót, tanított és biztosította szakmai fejlődésemet. Neki hála számos nemzetközi és helyi konferencián kamatoztathattam tudásomat, valamint lehetőségem volt egy Európai Konzorcium révén 3 hónapos szakmai, tanulmányi utazáson részt vennem Argentínában.

Köszönetet szeretnék mondani az intézet vezetőjének, **Dr. Matolcsy András professzor úrnak**, hogy lehetőséget biztosított az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben tudományos munkáim végzéséhez.

Köszönöm, minden jelenlegi és egykori Molekuláris Patológia dolgozójának a motiváló, segítőkész szakmai környezetet és baráti légkört: **Dr. Papp Gergőnek, Dr. Horváth Zsoltnak, Dr. Mervai Zsoltnak, Dr. Váncza Lórándnak, Dr. Regős Eszternek, Egedi Krisztinának, Császár Krisztinának, Oláhné Nagy Júliának és Karázi Katalinnak.**

Külön hálám szeretném kifejezni **Dr. Dezső Katalinnak**, hogy a dolgozatom házi bírálatát elvállalta.

Hálával tartozom továbbá szüleimnek, **Reszei Sándornénak és Reszei Sándornak**, valamint testvéreimnek, **Reszei Tímeának és Reszei Sándornak**, köszönöm nekik, hogy tanulmányaim során türelemmel és megértéssel támogattak, és minden helyzetben mellettem álltak, nélkülük most nem tartanék itt.