

# Új molekulák és jelátviteli folyamatok fibrotikus elváltozásokban

Doktori tézisek

**Dr. Péterfi Zalán**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



**Témavezető: Dr. Geiszt Miklós** egyetemi docens

## **Hivatalos bírálók:**

Dr. Kiss András egyetemi docens

Dr. Bácsi Attila, egyetemi docens

## **Szigorlati bizottság elnöke:**

Dr. Falus András, egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

## **Szigorlati bizottság tagjai:**

Dr. Arányi Tamás, tudományos főmunkatárs, PhD

Dr. Bánhegyi Gábor, egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest

2012.

## 1. Bevezetés

A fibrózist gyakran határozzák meg úgy, mint egy olyan sebgyógyulási folyamatot, amely kikerül a normális szöveti kontroll alól. A sérült szövetek regenerációja esszenciális az élő többsejtes szervezetek túlélése szempontjából, amely során a sérült vagy elhalt sejtek egy szigorúan szabályozott folyamatban épekre cserélődnek ki. A sérülésnek számtalan akut és krónikus forrása lehet, mint például fertőzések, autoimmun folyamatok, sugárzás, kémiai noxák és mechanikai stressz okozta károsodások. A helyreállítási folyamat alapvetően két úton mehet végbe: Az első típus az úgynevezett regeneratív út, amikor a sérült sejteket a szervezet ugyanolyan sejtekkel pótolja. A második típust, amely akkor jön létre, ha az első út elégtelen vagy valamiért nem lehetséges, és az eredeti szövet kötőszövetes átalakulásával jön létre, fibropláziának vagy fibrotikus sebgyógyulásnak nevezik. Ez a második út kezdetben előnyös a szervezet számára, azonban ha a szabályozása nem megfelelő, az ép szövet irreverzibilisen lecserélődik egy extracelluláris mátrixban (ECM) gazdag, a szövet eredeti funkcióival nem vagy csak részlegesen rendelkező hegszövetre. Sok betegségben, például az idiopathiás tüdőfibrózisban, májcirrhosisban, kardiovaszkuláris fibrózisban, és a vese tubulointersticiális fibrózisában ez az extenzív szövet remodeling végül a szerv elégtelenségéhez és halálhoz vezethet. Egyes adatok szerint a fejlett országok összhalálzásának mintegy 45%-áért valamilyen szövet vagy szerv fibrotikus elváltozása tehető felelőssé.

A fibrózisra jellemző szöveti átépülésben kulcsszerepet játszanak a myofibroblaszt sejtek, melyek főként aktív extracelluláris mátrix képzésük révén járulnak hozzá a folyamathoz. A myofibroblasztok többféle rezidens és a keringéssel odakerülő sejtből is kialakulhatnak. Egy ilyen kialakulási mód a dolgozatomban részletesen bemutatott és vizsgált epitheliális mesenchymális tranzíció. Az epitheliális-mesenchymális tranzíció kulcsszerepet tölt be a szövetek fejlődésében valamint a karcinogenezis és a fibrózis folyamatában. Korábbi eredmények azt mutatják, hogy ez a folyamat központi szerepet játszik a krónikus vesebetegségekben lezajló tubulo-intersticiális fibrózisban (TIF). A tubulo-intersticiális fibrózis során jelentősen lecsökken a vesében az intakt funkcióval bíró tubulussejtek száma és ezzel párhuzamosan nagy számban jelennek meg kötőszöveti rostokat termelő fibroblasztok, és sima izom aktint expresszáló myofibroblasztok. A TIF egy transzgenikus egér modelljében a kialakuló myofibroblasztok majdnem 40%-a bizonyult epitheliális mesenchymális átalakuláson átesett tubuláris hámsejt eredetűnek. A folyamat első lépése egy a hámot ért sérülés, az intercelluláris kapcsolatok legalább részleges elvesztése. Majd ezt követően ezek a sejtek a gyulladáshoz vezető citokin TGF- $\beta$ 1 hatására mennek keresztül az átalakuláson. A folyamat alatt a sejtek elvesztik eredeti poligonális alakjukat, valamint egy részét az eredeti funkciójuknak, például a tubuláris szekréció és reabszorpció képességét. Ezzel párhuzamosan új tulajdonságok is megjelennek, elkezdnek extracelluláris mátrix proteinek termelni, mint amilyen

a fibronectin vagy a kollagén, és elkezdik expresszálni a myofibroblaszt fenotípus egy jellegzetes fehérjéjét a sima izom aktint (SMA). Mi ebben a munkában a kontaktsérülés és a sima izom aktin gén közötti jelpályát vizsgáltuk. Irodalmi adatokból ismert, hogy simaizomsejtekben az SMA gén fő szabályzó fehérjei a serum response factor (SRF) és koaktivátorai a myocardin related transcription factorok.(MRTFA, B) Ezeknek a koaktivátoroknak a szabályozása elsősorban sejten belüli elhelyezkedésük megváltoztatása által történik. Nyugalmi körülmények között a cytoplazmában az MRTF G-aktinhoz kötődik és ez komplex nem képes bejutni a magba. Ha azonban egy stimulus hatására megnő a sejtben a Rho kis GTP-áz fehérje aktivitása, ez a G-actin F-actin szálakba történő beépüléséhez vezet, az így felszabaduló MRTF már képes a nukleuszba transzlokálódni. Itt az SRF-fel dimert alkot és fokozza célgénjei expresszióját. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy epithel sejtekben a kontaktsérülést követően lehet-e szerepe ezeknek a faktoroknak az SMA génjének szabályozásában.

A doktori munkám jelentős részében két az extracelluláris mátrixban található peroxidáz, a PXDN és a PXDNL vizsgálatával foglalkoztam. A peroxidazinok az állatvilágban széles körben megtalálható, igen konzervált fehérjék. Az emberi peroxidazin fehérjék (PXDN vagy VPO1: vascular peroxidase 1 és PXDNL: peroxidasin-like vagy VPO2: vascular peroxidase 2) egyedülálló szerkezeti sajátosságokkal rendelkeznek a peroxidázok között, mert peroxidáz-homológ doménjeik mellett az extracelluláris mátrix

fehérjékre jellemző motívumokat is tartalmaznak. A peroxidazint részletesen először *Drosophilában*, majd humán sejtvonalakban tanulmányozták, azonban Génbankból származó adatok alapján ezeken kívül még számos fajban megtalálható. A humán peroxidazin tartalmaz N-terminálisan egy extracellulárisan irányító szignál peptidet, extracelluláris mátrix motívumokat, mint az N-terminális leucin- illetve cisztein-gazdag régiók, a C-terminális cisztein-gazdag régió és az alfa-helikális rész; négy immunglobulin hurkot; valamint az emberi peroxidázokkal nagyfokú homológiát mutató peroxidáz domént, amely a hemkötés és az enzimatis aktivitás szempontjából kritikus aminosavakat a megfelelő pozíciókban tartalmazza. A humán peroxidazint kódoló mintegy 7,5 kilobázis hosszúságú mRNS a felnőtt szövetekben széles körben kifejeződik, saját eredményeink alapján legnagyobb mennyiségben a szívben, a placentában, a lépben, a tüdőben, belekben, valamint a bőrben. A normál szöveteken kívül expresszálódik még különböző tumorokban, mint pl. melanomákban vagy egyes emlődagatokban. Az enzimatis aktivitást illetően a *Drosophila* peroxidazinra vonatkozó adatok szerint a fehérje *in vitro* heme-t köt és képes a klasszikus peroxidázokra jellemző reakciók katalizálására. A hagyományos peroxidáz szubsztrátokat általában más, jól ismert peroxidázokhoz képest, amilyen a laktoperoxidáz, a myeloperoxidáz vagy az ovoperoxidáz, kisebb sebességgel alakítja át. A tirozin jelenlétében történő ditirozin képződés azonban az előbbi enzimekhez viszonyítva nagyobb sebességgel megy végbe peroxidazin által katalizáltan.

## **2. Célkitűzések**

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki magunk elé:

*1. A heterológ módon expresszált MRTF-transzkripciós faktorok jellemzése LLC-PK1/AT1 sejtekben.*

*2. A PXDN fehérje vizsgálata in vitro és in vivo.*

*3. A PXDN egy humán homológja a PXDNL jellemzése.*

### 3. Módszerek

#### *Anti-PXDN és PXDNL ellenanyag*

Nyulakat immunizáltunk a PXDN C-terminális részét (1329-1479 AS) vagy a PXDNL C-terminális részét (1312-1463 AS) tartalmazó GST fúziós fehérjével, majd a szérumból ugyanezekkel az Affigel 10 (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) gyöngyre kötött antigénnel affinitáskromatográfiás eljárással tisztítottuk a poliklonális ellenanyagunkat.

#### *Sejtkultúra*

A COS-7 sejteket 10% FBS-t, 50 U/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint tartalmazó Glutamax DMEM médiumban növesztettük. A humán primer tüdőfibroblasztokat (PromoCell, Heidelberg, Germany) 2% FBS, 5 µg/ml Insulin, 1 ng/ml FGF tartalmú FBM-ben növesztettük. Az EMT kísérleteinkhez sertés eredetű, proximális tubulus hámsejt vonalat, az LLC-PK1 sejteket használtunk. Az eredeti vonalból szelektált C14 klón, amely az angiotenzin II AT1-es receptorát stabilan expresszálja Dr. R. Harris ajándéka. Az LLC-PK1 sejtek széles körben használt, jól karakterizált alanyai nefrológiai és fiziológiai kutatásnak. A sejteket alacsony glukóz tartalmú Duplecco's Modified Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük (1000 mg/l glukóz) a következőkkel kiegészítve: 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10%

FBS. Minden sejtet 5% CO<sub>2</sub>-tartalmazó, vízgőzzel telített inkubátorban tenyésztettünk 37 °C-on. A TGF-β1 kezeléseket megelőzően a sejteket 0,05% FBS tartalmú médiumban tartottuk egy éjszakán keresztül. A TGF-β1 (R&D Systems) kezelés szérumentes környezetben történt 24-48 órán keresztül. Az esetek egy részében a kezeléseket kiegészítettük 100 μM δ-aminolevulinsav (Sigma-Aldrich) hozzáadásával.

Az extracelluláris kalcium szint csökkentéséhez a sejteket alaposan mostuk kalciummentes foszfát puffer oldattal (PBS), majd megfelelő mennyiségű szérumentes, alacsony kalcium koncentrációjú DMEM (Gibco-BRL) oldatot adtunk a tenyésztőedényekbe. A sejtek a kalcium-függő sejtadhéziók hiányában kb. 30 perc alatt szeparálódtak egymástól.

Az emlős expressziós vektorokat Fugene6, Fugene HD (Roche Diagnostics), Lipofectamine 2000 vagy Lipofectamine LTX (Life technologies) transzfekciós reagensek segítségével juttatuk a sejtekbe a gyártók által ajánlott utasításoknak megfelelően. Az siRNS transzfekciókhoz Interferin siRNA (Polyplus Transfection) vagy RNAiMAX (Invitrogen) reagenseket használtunk.

#### *Western blot kísérletek*

A fehérjemintákat 4x Laemmli pufferben vettük fel, majd 10 percig 100 °C-on denaturáltuk. Ezek után a mintákat 8 vagy 10 %-os, SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk. A gélen elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk (12 óra, 45 V), majd 5 %-os



tejpport és 0,1 % Tween20-at tartalmazó PBS-ben blokkoltuk. Az elsődleges antitestekkel 1 órát inkubáltuk a blokkoló oldatban szobahőmérsékleten, majd 6x5 perces mosás után, HRP-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitestet (Amersham Pharmaceuticals) használtunk 1:5000 hígításban, melyet egy kemilumineszcencia elven működő eljárással (ECL, GE Healthcare) előhívtunk, majd a jelet FUJI Super RX filmen detektáltuk. A PXDN precipitációs kísérletekhez a 1:4 arányban 100 % triklór-ecetsavat adtunk a sejtekről eltávolított médiumhoz. A mintákat 10 percig jégen tartottuk, majd a precipitátumot kifugáltuk az oldatból (14K rpm, 5 perc). A csapadékot ezután 3x jéghideg acetonnal mostuk, majd 95 °C-ra helyeztük 5 percre. A kiszárított mintát 4x Laemmler pufferben vettük fel és 10 percig főztük mielőtt az SDS-poliakrilamid géltre töltöttük.

#### *Peroxidáz aktivitás mérése*

A PXDN cDNS-ével transzfektált COS-7 sejteket két nappal a transzfekció után 1 % hexadeciltrimetilammónium-bromidot tartalmazó PBS-ben lizáltuk, majd a lizátum peroxidáz aktivitását mértük Amplex Red H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Peroxidase Assay módszerrel (Molecular Probes) a használati utasításban leírtak szerint. A reakcióban keletkezett resorufin fluoreszcenciáját 30 perc után 550 nm-en excitálva 590 nm hullámhosszon mértük. Kontrollként üres pcDNA3.1 plazmiddal transzfektált COS-7 sejt-lizátumot használtunk.

*Az MRTF proteinek nukleáris/citoszolikus megoszlásának vizsgálata.*

Az MRTF-Flag festések kvantifikálásához az ImagePro Plus szoftvert használtuk. A fluoreszcencia intenzitását vagy három egy egyenes mentén elhelyezkedő véletlenszerűen kiválasztott ponton, vagy pedig három véletlenszerűen kiválasztott region of interestben (ROI) mértük meg a sejtmagban és citoplazmában. A két módszerrel nyert értékek szignifikánsan nem különböztek egymástól. A mag területén és a citoplazma területén mért három-három értékét átlagoltuk, majd ezt használtuk fel a mag/citoplazma hányados számításához. A mag pontos lokalizációjának meghatározásához DAPI festéket használtunk. Az így nyert értékeket aztán három kategóriába soroltuk: Ha a hányados  $< 0,75$  a festődés citoszolikus, ha  $0,75$  és  $1,25$  közé esett, akkor a festődés mag és citoszol, ha pedig  $> 1,25$ , akkor nukleáris festődés kategóriába került.

#### 4. Eredmények és következtetések

Mivel az MRTF transzkripciós faktorok sejten belüli lokalizációja és szabályozása a kísérleteink kezdetén még nem volt ismert epitheliális sejtekben, ezért először összehasonlítottuk a két izoforma (MRTF-A, MRTF-B) elhelyezkedését a vese epithel eredetű LLC-PK1 sejtekben és a fibroblasztszerű CHO sejtekben. A CHO sejtekben mind az MRTF-A (67%), mind az MRTF-B (82%) döntően citoplazma festődést mutatott. Ezzel részben ellentétben az LLC-PK1 sejtek esetén az MRTF-A a legtöbb esetben (>70%) sejtmagba lokalizálódott, míg az MRTF-B döntően (>70%) citoszolikus maradt. Ezen eredmények tükrében megállapítható, hogy az MRTF fehérjék esetében jelentős sejtspecifikus különbségek figyelhetők meg az intracelluláris lokalizációban. Mivel LLC-PK1 sejtekben zömmel az MRTF-B lokalizált a citoszolba, megvizsgáltuk, hogy van-e valamilyen hatása a Rho jelátvitelének a fehérje disztribúciójára. A sejtmagban található MRTF-B relatív aránya mintegy nyolcszorosára nőtt az aktív Rho jelenlétében, ami felveti a Rho szerepét a transzlokáció szabályozásában. Ezek után arra voltunk kíváncsiak, hogy az MRTF-B-vel transzfektált LLC-PK1 sejtek hogyan viselkednek  $Ca^{2+}$ -mentes környezetben, mellyel a kontaksérülést modelleztük. A kalcium megvonás hatására a nukleáris MRTF-B festődést mutató sejtek aránya 2,5-szeresére nőtt.

Ha egy p190GAP overexpressziója segítségével interferáltunk az endogén Rho aktivitással, ez a hatás szinte teljesen kiküszöbölhető volt. Az előbb felsorolt eredmények nagyban hozzájárultak, ahhoz hogy a kontaktsérülés indukálta Rho, ROK, pMLC mediálta MRTF transzlokációt egy új, központi jelátviteli mechanizmusként azonosítsuk az epitheliális mesenchymális átalakulás szabályozásában.

A PXDN jellemzése során megállapítottuk, hogy a fehérje jelen van humán primer fibroblasztokban. Ezekben a sejtekben a fehérje az endoplazmás retikulumban helyezkedik el. *In vitro* kísérleteinkben azt találtuk, hogy TGF- $\beta$ 1 hatására a PXDN jelentős expresszió-fokozódást mutatott és megfigyeltük, hogy a sejtek  $\delta$ -amino-levulinát jelenlétében médiumba szekretálják a fehérjét. Az extracelluláris mátrixban a fehérje a fibronectinnel részben kolokalizálva hálózatos struktúrát hoz létre. Az endogéne kifejeződő fehérjének nem detektáltuk peroxidáz aktivitását, valamint csendesítésének nem volt mérhető következménye a sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésében, ennek ellenére mégsem zárható ki, hogy a peroxidazin aktív peroxidázként szekretálódik a differenciálódó fibroblasztokban. Egy egér vesefibrózis modellben, az unilaterális ureter obstrukcióban megemelkedik a PXDN expressziója a fibrotikus vesében. Immunfestések segítségével kimutattuk, hogy a fehérje a peritubuláris térbe kerül és ott kolokalizál a fibronectinnel. Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy TGF- $\beta$ 1 hatására létrejövő expressziófokozódás és szekréció nemcsak a sejt-kultúra

körülményei között, hanem *in vivo* is létrejön. Eredményeink arra utalnak, hogy a myofibroblasztok egy emlős peroxidázt a peroxidazint is szekretálják, ami beépülve az extracelluláris mátrixba egy új, korábban nem ismert módja az extracelluláris mátrix szintézisnek.

Azonosítottunk és megklónoztunk egy új emberi génterméket, a PXDNL-t, amely nagyban homológ a humán peroxidazinnal. Az mRNS expressziós mintázata szerint az emberi szervezetben csak a szívben fejeződik ki. Northern blot kísérleteink alapján a szíven belül egyenletesen oszlik el a kódoló mRNS, amely jó összhangban van az *in situ* hibridizációs eredményeinkkel, melyek szerint a cardiomyocyták expresszálják a gént. A *pxdnl* expressziója jelentősen fokozódik dilatatív cardiomyopathiában, ami felveti esetleges szerepét ebben a kórfolyamatban. A szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy a fehérje néhány, a peroxidáz domén hem kötéséhez elengedhetetlen konzervált aminosavat nem tartalmaz. Kimutattuk, hogy a PXDN-nel szemben a fehérjének nincs peroxidáz aktivitása, ami valószínűleg összefüggésben van a konzervált aminosavak hiányával. Immunfestéseket végeztünk PXDNL transzfektált sejteken és megállapítottuk, hogy a szignálunk kolokalizál a PDI jelölődéssel, ami arra enged következtetni, hogy a fehérje az endoplazmás retikulumban található. Emberi szívben és cardiomyocytákban a fehérje az endoplazmás retikulum mellett a sejtek membránjainak találkozásánál az Eberth féle vonalnak megfelelően is detektálható. Munkánk során megállapítottuk, hogy a

PXDNL képes diszulfid hidakon keresztül fehérje-fehérje asszociációkat kialakítani. A protein komplexek molekulatömege alapján elképzelhető, hogy a PXDNL oligomerizálódik és azt is kimutattuk, hogy a fehérje képes a PXDN-nel összekapcsolódni. A kizárólagos szíven belüli expresszió, valamint a fehérje doménstruktúrája, szekréciós szignálszekvenciája, valamint immunfestéseink felvetik a lehetőségét, hogy a szíven a PXDNL-nek járulékos extracelluláris mátrix megerősítő funkciója lenne.

## 5. Saját közlemények jegyzéke

### **A dolgozat alapjául szolgáló közlemények és kézirat:**

Peterfi Z, Donko A, Orient A, Sum A, Prokai A, Molnar B, Vereb Z, Rajnavolgyi E, Kovacs KJ, Muller V, Szabo AJ, Geiszt M

Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney

***AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 175:(2) pp. 725-735. (2009)**

IF: 5.673

Fan LZ, Sebe A, Peterfi Z, Masszi A, Thirone ACP, Rotstein OD, Nakano H, McCulloch CA, Szaszi K, Mucsi I, Kapus A  
Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the Rho-Rho kinase-phospho-myosin pathway  
***MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 18:(3) pp. 1083-1097. (2007)**

IF: 6.028

Zalán Péterfi, Zsuzsanna E. Tóth, Adrienn Sum, Hajnal A. Kovács, Ágnes Donkó, Ajay M. Shah and Miklós Geiszt

Identification of a cardiac specific form of cell adhesion in the human heart

2012 (publikációra előkészítve)

### **Egyéb közlemény**

Lanyi A, Barath M, Peterfi Z, Bogel G, Orient A, Simon T, Petrovszki E, Kis-Toth K, Sirokmány G, Rajnavolgyi E, Terhorst C, Buday L, Geiszt M

The Homolog of the Five SH3-Domain Protein  
(HOFl/SH3PXD2B) Regulates Lamellipodia Formation and  
Cell Spreading

***PLOS ONE* 6:(8) Paper e23653.** (2011)

IF: 4.411

Donko A, Ruisanchez E, Orient A, Enyedi B, Kapui R, Peterfi Z,  
de Deken X, Benyo Z, Geiszt M

Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the  
activation of Duox1

***FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE* 49:(12) pp.**  
**2040-2048.** (2010)

IF: 5.707

Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M.

Dual oxidases

***PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS B BIOLGICAL***  
***SCIENCES* 360:(1464) pp. 2301-2308.** (2005)

IF: 6,325



