

LONOVICS JÁNOS OTKA ZÁRÓJELENTÉS

OTKA azonosító: 76844

A daganatos és stroma sejtek közötti interakciók vizsgálata a gyomorrák kialakulásában és progressziójában. Klinikai és kísérletes vizsgálatok.

I. év

Az első évben a daganatos és nem daganatos myofibroblasztok közötti funkcionális összehasonlítást végeztük. Megvizsgáltuk, hogy a milyen mértékben és milyen kinetikával szekretálják a myofibroblasztok a proliferációt és migrációt fokozó anyagok (Pl. IGF, MMP) kiválasztását. A 10 önkonrollok (tumoros-nem tumoros) kísérlet egyértelműen bizonyította, hogy a nem tumoros eredetű normál myofibroblasztoknak regulált szekréciónak van, melynek során inger hatására pulzusszerűen választják ki ezeket az anyagokat, majd a szekréció megáll. Ezzel szemben a tumoros eredetű myofibroblasztok már kevésbé differenciáltabbak, ők konstitutív szekréciónal folyamatosan szekretálják ezeket az anyagokat, azaz jelentősen szerepet játszanak a tumoros sejtek migrációjában és proliferációjában.

Szintén megvizsgáltuk ezen sejtek sav-bázis transzportereit és azt tapasztaltuk, hogy a Natrium-Hidrogén exchanger (NHE)-1 es izoformájának a gátlása jelentősen csökkenti a migrációs és proliferációs aktivitását a sejteknek ezáltal ezek a transzporterek új terápiás célpontok lehetnek daganatos megbetegedésekben.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a tumoros és nem tumoros eredetű myofibroblasztok között milyen genetikai változások vannak. Mutációt nem, de jelentős epigenetikai eltéréseket találtunk.

II. év

Ebben a periódusban karakterizáltuk a myofibroblasztok sav-bázis transzportereit. Megállapítottuk, hogy a Nátrium-Hidrogén kicserélő csatorna (NHE) 1-es izoformája 80%-ban felelős a H⁺ sejtől történő kipumpálásában. Megállapítottuk, hogy a tumor eredetű myofibroblasztok migrációja és proliferációja nagyobb, ami aktívabb NHE1 működéssel jár. Az NHE1 csatorna szelektív gátlása csökkentette a tumor eredetű myofibroblasztok bazális proliferációs és migrációs aktivitását. Kimutattuk, hogy azok az anyagok, amelyek a migrációt és proliferációt stimulálják, fokozzák az NHE1 aktivitását. Az NHE1 amiloriddal történő gátlása viszont csökkenti a migrációs és proliferációs aktivitását a sejteknek. Kísérleteinkkel új tumor ellenes támadáspontot sikerült kimutatnunk.

III. év

A HGM-ok azonosítása immunocitokémia eljárással történt. A miofibroblasztok pozitív festődést mutattak α -smooth muscle actin-ra és vimentin-re, míg az epiteliális markerként használt citokeratin és az izomsejt markerként használt dezmin esetén nem tapasztaltunk festődést.

A következő lépésben mikrofluorometriás technika felhasználásával kimutattuk, hogy a HGM-ok kezdeti pH-ja 7.09 ± 0.02 , ami megegyezik a fibroblasztok és sima izom sejtek kezdő pH értékével. Ezt követően megvizsgáltuk a sav/bázis iontranszporterek jelenlétét a HGM-ok membránján. 3, funkcionálisan aktív iontranszportert sikerült azonosítanunk, név szerint, a Na⁺/H⁺ kicserélőt (NHE), a Na⁺/HCO₃⁻ kotranszportert (NBC) és a Cl⁻/HCO₃⁻ kicserélőt (AE). Az iontranszporterek aktivitását az ammónia pulzus technika segítségével becsültük

meg. Az alkalózisból történő regeneráció mértéke, az AE aktivitását, míg az acidózisból történő regeneráció mértéke, az NHE és NBC aktivitását tükrözi HCO_3^- jelenlétében. Mivel a legnagyobb aktivitást a NHE esetében kaptuk a továbbiakban ezen iontranszportert karakterizáltuk. Elsőként megvizsgáltuk mely NHE izoformák fordulnak elő a HGM-ban. Az egyes NHE izoformák aktivitásának a vizsgálata, egy specifikus NHE inhibitor, HOE-642 felhasználásával történt. A HOE-642 izoforma specifitása koncentráció-függő. $1 \mu\text{M}$ koncentrációban csak az NHE1-et, míg $50 \mu\text{M}$ koncentrációban mind az NHE1-et mind pedig a 2-öt gátolja. Kísérleteink azt mutatták, hogy az össz NHE aktivitás körülbelül 85%-ért az NHE1 izoforma felelős, körülbelül 10%-ért az NHE2 izoforma, míg a maradék aktivitás egyéb NHE izoformáknak tudható be.

Az NHE-1 jelenlétét mind transzkripciós mind pedig transzlációs szinten sikerült kimutatnunk, PCR és western blot technikák felhasználásával. Ezzel szemben az NHE-2 és -3 izoformák jelenlétét csak mRNS szinten sikerült kimutatnunk.

A következő lépésben megvizsgáltuk az IGF-II és a carbachol hatását az NHE izoformák aktivitására. Kimutattuk, hogy mind az IGF-II (10 illetve 100 ng/mL) mind pedig a carbachol ($1-1000 \mu\text{M}$) dózis-függően stimulálta az NHE-eket.

A HGM-ok migrációját mind az IGF-II (100 ng/mL) mind pedig a carbachol stimulálta. Az NHE1 inhibitor, HOE-642 ($1 \mu\text{M}$) nem befolyásolta a nem stimulált sejtmigrációt, míg erőteljesen gátolta a stimuláltat. A proliferációs vizsgálatok azt mutatták, hogy 100 ng/ml IGF-II stimulálta a sejtosztódást, amely $1 \mu\text{M}$ HOE-642 jelenlétében teljes mértékben gátlódott. A carbachol nem befolyásolta a HGM-ok proliferációját. Ezen eredményeink azt sugallják, hogy az NHE1 izoforma fontos szerepet játszik az IGF-II- illetve carbachol-stimulált migrációban, valamint az IGF-II-stimulált proliferációban.

IV. év

A HMG-k kontraktilis sejtek, melyek számos funkciójuk mellett részt vesznek az extracelluláris mátrix képzésében, sebgyógyulásban, gyulladás folyamatában és tumorgenezisben. Míg a sebgyógyulást migrációs és proliferációs képességük segíti, a daganatok képződése során az angiogenezisben és áttétképződésben játszanak fontos szerepet bioaktív anyagok szekretálásával. Ismeretes, hogy ezen folyamatokban kitüntetetten fontos szabályozó szerepe van az intracelluláris kalciumnak (Ca^{2+})_i. Mivel a nátrium-kalcium kicserélők (NCX) meghatározó szerepet töltenek be a kontraktilis sejtek (Ca^{2+})_i homeosztázisában, így jelen tanulmányban célul tűztük ki a HGM sejtek kalcium homeosztázisának vizsgálatát az NCX-re vonatkozóan, illetve az NCX szerepének vizsgálatát a HGM sejtek proliferációjában, migrációjában.

Az NCX jelenlétének igazolására PCR technikát és immuncitokémiás eljárást használtunk. Az NCX funkcionális kimutatásához a HGM sejtek (Ca^{2+})_i és (Na^+)_i szintjét mikrofluorometriás módszerekkel, ionelvonásos technikákkal és NCX inhibitorok alkalmazásával mértük. Az NCX gátlás hatását a sejtek proliferációs és migrációs folyamataira a purin analóg EdU inkorporációs technikával és a „karc sebzéses” sejtváندorlási vizsgálattal végeztük.

Az NCX mRNS szinten történő kifejedését PCR technikával vizsgáltuk, és kimutattuk az NCX mindhárom izoformáját (NCX1, NCX2, NCX3). Immuncitokémiás eljárással eddig az NCX1 és NCX2 jelenlétét mutattuk ki.

Mikrofluorometriás méréseink során a HGM-ek jelentős része ($50,38 \pm 4,35 \%$) spontán kalcium oszcillációs aktivitást mutatott. A spontán oszcillációkra a feszültségfüggő kalcium csatorna blokkoló verapamil és nimodipin nem volt hatással. Azonban extracelluláris kalcium és nátrium hiányában az oszcillációk megszűntek, ezáltal bizonyítva egy extracelluláris nátrium és kalcium függő kalcium transzporter jelenlétét és funkcionális működését a HGM sejteken. A nem oszcilláló sejteken nátrium és kalcium elvonásos technikákkal a sejten belüli

nátrium és kalcium koncentráció szintén változtatható volt. Ezen mérések arra engednek következtetni, hogy a HGM sejtek nátrium és kalcium homeosztázisában az NCX meghatározó szerepet játszik. NCX inhibitorok alkalmazása nem befolyásolta a sejtek intracelluláris nátrium szintjét, azonban a kalcium oszcillációt mutató sejtekben megszüntette az oszcillációkat. A nem specifikus, reverzibilis NiCl_2 alkalmazását követően az oszcillációk visszatértek, azonban a specifikus, irreverzibilis CB-DMB hatására az oszcillációk az inhibitor kimosása után sem jelentek meg. Ezen mérésekből arra következtethetünk, hogy az NCX szerepet játszik a HGM sejtek kalcium homeosztázisának szabályozásában, valamint spontán, nem szinkronizált kalcium oszcillációk létrehozásában. Ezen tények ismeretében megvizsgáltuk az egyes NCX gátlószerek jelenlétében a HGM sejtek proliferációs és migrációs képességét. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy NCX inhibitorok alkalmazása szignifikánsan csökkenti a HGM sejtek mind bazális, mint insulin-like growth factor II (IGF-II)-val stimulált proliferációját és migrációját.

Eredményeink azt mutatják, hogy a NCX-ek fontos szerepet játszanak a HGM sejtek spontán, nem szinkronizált kalcium oszcillációk kialakításában, kalcium homeosztázisuk fenntartásában, továbbá a HGM sejtek fontos funkcióiban, így azok proliferációjában és migrációjában. Mivel a myofibroblasztok szerepet játszanak olyan kórélettani folyamatokban, mint a krónikus gyulladás és tumorgenezis, így felmerül, hogy az NCX-ek funkciójának módosítása potenciális terápiás hatással rendelkezhet hiperproliferatív elváltozásokban, azonban ennek eldöntése további vizsgálatokat igényel.

A feltöltött közleményeken kívül jelenleg revízió alatt van az alábbi közlemény:

GI-00394-2012 Kemény LV et al.: Sodium-calcium exchangers regulates the migration and proliferation of human gastric myofibroblasts. *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology* (IF:3.431)