

## SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve : **Dr. Mucsi István**

A téma címe **Sejt-sejt és sejt-mátrix interakciók szerepe a progresszív  
vesefibrózis patomechanizmusában**

OTKA Nyilvántartási szám: **T 042651**

A kutatás időtartama: **2003-2006**

### **Epithelialis-mesenchymalis átalakulás**

Az elmúlt évek jelentős felfedezése, hogy az egyedfejlődésben és a tumorbiológiában is fontos szerepet játszó EMT feltehetően a progresszív vesefibrózis patomechanizmusának egyik központi eleme. E folyamat során először a vese tubulus sejtek egymás közötti kapcsolatai (adherens junctio, tight junction) fellazulnak, illetve megszűnnek, s megváltozik a sejtek alakja, motilitása. E folyamat egyik fontos lépése a citoszkeleton átrendeződése, s mesenchymalis markerek, többek között az alpha-simaizom sejt aktin (SMA) fokozott termelődése. Az itt ismertetett kísérletekben a transforming growth factor-beta (TGF) hatására bekövetkező epithelialis-mesenchymalis transzformáció (EMT), illetve a vese tubulus sejtekben e folyamat során megjelenő SMA expresszió szabályozásában szerepet játszó jelátviteli rendszerek, a Smad fehérjék, a mitogén aktiválta protein kinázok (MAPK; p38 MAPK és az Extracelluláris Szignál Regulálta Kináz - ERK) és a p21 GTP-áz család tagjai, nevezetesen a p21 RhoA, Rac1 és a CDC42 szerepét vizsgáltuk.

E kérdések megválaszolására sokoldalú módszertani megközelítést alkalmaztunk. Kísérleteink túlnyomó többségét sertés proximális tubulus sejteken (LLC-PK/AT1) végeztük. A jelátviteli folyamatok vizsgálatát tranziens transzfekciós kísérletekben kezdtük meg, melyekben promóter-riporter konstruktot és a különböző jelátviteli folyamatokat befolyásoló plazmidokat juttattunk a sejtekbe. Más kísérletekben specifikus gátlószerekkel kezeltük a sejteket, s a jelátviteli molekulák aktiválódását foszfo-specifikus antitestekkel végzett Western blottal mértük. Megint más kísérletekben rekombináns adenovírusokat használtunk a jelátviteli folyamatok befolyásolására. A p21 GTP-áz család tagjainak aktiválódását „overlay assay” segítségével mértük. A sejtkapcsolatok szerepét a sejtréteg konfluencia szintjének megválasztásával, az epithel réteg sebzésével vagy az extracelluláris kalcium

megvonásával tanulmányoztuk. A különböző kezelések hatásait a megfelelő sejtalkotó fehérjék Western blottal történő kimutatásával vagy a különböző proteinek és a citoskeleton egyes alkotórészeinek immunfestésével követtük.

#### Az ERK és a p38 MAPK szerepének vizsgálata

Kimutattuk, hogy sertés proximális tubulus sejtekben TGF hatására mind az ERK, mind a p38 MAP kináz aktiválódik. Ez az aktiválódás igen érdekes, kétfázisú kinetikát mutatott: a 30-60 percen belül megjelenő, viszonylag gyors aktivációt egy 8-12 óra után következő lassú indukálódás követte. Mind az ERK, mind a p38 MAPK farmakológiai gátlása gátolta a SMA promóter aktiválódását és a SMA fehérje termelődését is. A p38 MAPK aktiválódását kivédő rekombináns domináns negatív (DN) MKK3/6 adenovírusok alkalmazása további bizonyítékkal szolgált, hogy a p38 kaszkád fontos szerepet játszik a SMA expresszió EMT során bekövetkező indukálásának szabályozásában.

RT PCR segítségével azt találtuk, hogy sejtjeinkben a p38-beta és a delta izo-enzim expresszálódik. A tubulus sejtek DN p38-beta adenovírussal való megfertőzése kivédte a SMA TGF által kiváltott termelődését, s ez megerősítette, hogy a TGF hatásában ez az izo-enzim szerepet játszik.

#### A SMAD fehérjék szerepének vizsgálata

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a Smad2 és a Smad3 fehérje TGF hatására gyorsan foszforilálódott. Ez a hatás mindkét fehérje esetében igen gyors volt, a TGF kezelést követő 15 percen belül megjelent. Érdekes módon a Smad2 fehérje aktiválódása a MAPK kinázok esetében látotthoz hasonlóan bifázisos mintázatot követett, míg a Smad3 aktiválódás átmeneti volt.

A Smad fehérjéknek a SMA expresszióban játszott funkcionális szerepét tranziens transzfekciós kísérletekben és a tubulus sejtek rekombináns adenovírusokkal történő fertőzésével tisztáztuk. A Smad fehérjék gátlása DN Smad3 és a Smad fehérjéket gátló Smad7 plazmidok ko-transzfekciójával nagymértékben gátolta a TGF hatására bekövetkező SMA promóter aktiválódást. Hasonlóképpen, a Smad jelátvitel gátlása DN Smad3 vagy Smad7 fehérjét kifejező rekombináns adenovírusokkal gátolta a SMA fehérje megjelenését, illetve a simaizomsejt aktin fehérje beépülését a citoskeleton aktin-rostjaiba.

#### Az adherens junctio és a $\beta$ -catenin fehérje szerepe

Egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy a a sejtkapcsolatok fenntartásában fontos szerepet játszó E-cadherin down-regulálása a TGF által kiváltott EMT egyik első lépése. Feltételeztük, hogy a TGF EMT-t indukáló hatásában központi szerepe van a sejtkapcsolatok változásainak vese proximális tubulus sejtekben is.

Ezt a feltételezésünket megerősítette, s további kísérleteink alapjául szolgált az a megfigyelésünk, hogy a TGF csak szubkonfluens tubulus sejt tenyészetben volt képes EMT-t kiváltani, míg ilyen hatást a citokin teljesen konfluens tenyészetben nem váltott ki. Mindezek alapján azt feltételeztük, hogy a sejtkapcsolatok károsodása vagy hiánya szükséges a TGF hatás kialakulásához. E hipotézist három modell alkalmazásával teszteltük: megvizsgáltuk a TGF hatására szubkonfluens kultúrában létrejövő folyamatokat; konfluens kultúrában mechanikus sebzéssel szabad sejtszéleket hoztunk létre; Ca megvonással megbontottuk az epithel sejtek közötti adherens junctiókat kialakító E-cadherin molekulák közötti kapcsolatot. A TGF hatását a sejtek fibronectin termelő képességének, a SMA promóter aktiválódásának illetve a SMA fehérje mennyiségének követésével monitoroztuk.

Azt találtuk, hogy míg a TGF konfluens sejtrétegben nem idézett elő EMT-t, mindhárom említett modell visszaállította a TGF EMT-t indukáló hatását. A konfluens sejtréteg mechanikus sebzésekor azt találtuk, hogy az EMT-re jellemző fenti sejtválaszok csak a szabad sejtszéleken jöttek létre, a mélyebb sejtrétegekben, ahol a sejtkapcsolatok intaktak maradtak, már nem. Másfelől az EMT fenti részjelenségei teljes aktivitásukban megfigyelhetők voltak a konfluens sejtekben Ca megvonást követően, amikor is az E-cadherin molekulák közötti kapcsolatok megszűnnek.

A fent leírt jelenségeket szabályozó molekuláris mechanizmusok elemzése során azt találtuk, hogy a sejtkapcsolatok bármely módszerrel történő megszüntetésekor az adherens junctiókból felszabadult a beta-catenin nevű fehérje, amely a sejtkapcsolatokban játszott strukturális szerepe mellett transzkripciós ko-aktivátorként is funkcionál. Kimutattuk, hogy a TGF hatására bekövetkező SMA promóter aktiválódás és SMA fehérje termelődés részben beta-catenin dependens folyamat. Azt is kimutattuk, hogy a TGF specifikusan megakadályozza a sejtkapcsolatokból felszabaduló beta-catenin degradálódását.

Mindezen eredmények alapján egy olyan modellt feltételezünk, ahol az EMT kialakulásához mind egy kezdeti epithel sejt sérülés, mind az ezt követő TGF hatás szükséges.

## A citoszkeleton és a sejtek motilitási apparátusának szerepe az EMT szabályozásában

Kísérleteink további fókuszpontja az aktin-citoszkeleton és a sejtek motilitási apparátusa, valamint a transforming growth factor-beta (TGF) indukálta epithelialis-mesenchymalis transzformációt (EMT) szabályozó jelátviteli folyamatok közötti kapcsolat volt. A myosin könnyű lánc (myosin light chain – MLC) myosin könnyű lánc kináz (myosin light chain kinase - MLCK)-dependens foszforilációja számos intracelluláris folyamat modulátora. Kimutattuk, hogy proximális tubulus sejtekben TGF hatására intenzív MLC foszforiláció következik be. A sejtek inkubálása a MLCK-t gátló M7-tel kivédte a TGF hatására bekövetkező SMA szintézist. Tranziens transzfecciók kísérletekben a MLC nem-foszforilálható mutánsának ko-transzfecciója nagymértékben gátolta a TGF hatására bekövetkező SMA promóter aktiválódást. Mindezen adatok alapján feltételezhető, hogy a MLC foszforilációja fontos láncszem a TGF hatására bekövetkező citoszkeleton átrendeződés és géntranszkripció változások között.

További kísérletekben kimutattuk, hogy az adherens junctiók szétkapcsolása az extracelluláris Ca depléciója révén aktiválta a p21 Rho GTP-áz, valamint e GTP-áz effektorát, a Rho kináz (ROK). Eredményeink szerint a ROK aktiválódás a myosin könnyű lánc (myosin light chain – MLC) foszforilálódását eredményezte. Egyidejűleg azt találtuk, hogy a SMA aktiválása ROK dependens volt.

A fenti hatás közvetítésében szerepet játszó mechanizmusok tisztázása érdekében megvizsgáltuk, hogy a SMA expresszió indukálásáért legalábbis részben felelős transzkripció faktorok, a serum response factor (SRF) és a myocardin-related transcription factor (MRTF) részt vesznek-e a sejtkapcsoló struktúrák dezintegrációja és a SMA transzkripció indukálása közötti kapcsolat létrehozásában. A sejtkontaktusok károsodása jelentős mértékben fokozta a SRF nukleáris lokalizációját, s az MRTF sejtmagba történő transzlokációját idézte elő. Az SRF és az MRTF nukleáris transzlokációja Rho dependensnek bizonyult. A MLC foszforilációjának gátlása domináns gátló MLC mutáns transzfecciójával szintén csökkentette a két transzkripció faktor nukleáris redistribúcióját.

Megvizsgáltuk azt is, hogy az MRTF szerepet játszik-e a TGF által indukált EMT folyamatában. Szub-konfluens sejtekben, ahol a sejtkapcsolatok csak részben alakultak ki, a sejtek TGF-fel történő kezelése az MRTF jelentős mértékű, átmeneti transzlokációját idézte elő. Hasonló hatást láttunk az általunk korábban beállított sebzési modellben, ahol a

konfluens epithel sejtrétegben mechanikus sebzést hoztunk létre. E modellben a sebszéleken elhelyezkedő sejtekben, azaz amelyekben a sejtkapcsoló struktúrák részlegesen dezintegrálódtak, az MRTF a TGF hatására a sejtmagba transzlokálódott. Érdekes módon hasonló hatást konfluens sejtrétegben nem tapasztaltunk. Eredményeink arra utalnak, hogy az MRTF rendszer részt vesz a TGF által kontakt dependens módon indukált SMA expresszió fokozódásában.

#### A p21 GTP-áz család tagjainak szerepe az EMT szabályozásában

A korábban leírt kísérletek során elsősorban a RhoA szerepére koncentráltunk, ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a RhoA mellett a p21 GTP-áz család egyéb tagjai, nevezetesen a p21 Rac1 és a CDC42 szintén hozzájárulnak a vese tubulus sejtekben zajló EMT szabályozásához.

A sejtkapcsoló struktúrák  $Ca^{2+}$  révén létrehozott szétválása ugyanis mind a Rac1-et, mind a Cdc42-t aktiválja. Azt is megfigyeltük, hogy ezzel párhuzamosan ezen GTP-ázok egyik lehetséges effektora, a PAK (p21-activated protein kinase) foszforilálódik, azaz aktiválódik. E molekulák lehetséges szerepét megerősítették azok a kísérleteink, amelyekben a Rac1, Cdc42 vagy a PAK konstitutív aktív mutánsának az overexpressziója a MLC foszforilálódását, a SRF és a MRTF nukleáris transzlokációját, valamint az SMA promóter transzkripció aktivitásának jelentős fokozódását idézte elő. Másfelől a domináns gátló (DN)-Rac1, DN-Cdc42 vagy DN-PAK1 expressziója a tubulus sejtekben szignifikáns mértékben gátolta a sejtkapcsolók károsodása által kiváltott MRTF transzlokációt és SMA promóter aktiválódást. Ezen adatok együttesen arra utalnak, hogy a Rho GTP-áz család több tagja is hozzájárul a sejtkapcsoló struktúrák károsodása által kiváltott EMT szabályozásához, feltehetően részben az MRTF transzkripció kofaktor aktin/phosphomyosin-dependens nukleáris transzlokációja révén.

Számos malignusan transzformálódott sejtben kimutatták, hogy az EMT kiváltásában, illetve szabályozásában szerepet játszik a p21 Ras, a p21 Ras GTP-áz „szupercsalád” másik tagja is. Ezért a következő kísérletekben azt ellenőriztük, hogy e fehérje szerepet játszik-e a vese tubulus sejtekben a sejtkapcsolatok megszűnését követően megfigyelhető változásokban. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a Rho GTP-ázok szerepével ellentétben a Ras fehérje overexpressziója gátolta a  $Ca^{2+}$  megvonás által kiváltott SMA promóter aktiválódást, míg a DN-Ras mutáns erősen fokozta a promóter transzkripció aktivitását.

Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a Rho illetve a Ras GTP-ázok az SMA transzkripció sejt-kontakt dependens szabályozásában ellentétes szerepet játszanak.

### **A renin-angiotensin rendszer (RAS) szerepe a vesefibrózis progressziójában**

#### A plasminogén aktivátor inhibitor promóterének szabályozása tubulus sejtekben

Az elmúlt években a sejtkapcsolatok és a különböző humorális faktorok mellett számos tanulmányban vizsgálták a sejt-mátrix kapcsolatok jelentőségét az EMT kiváltásában és szabályozásában. Több munkacsoport kimutatta, hogy az Extracellularis Matrix (ECM) összetételének megváltozása s a sejt-mátrix kapcsolatokban bekövetkező változások szintén hozzájárulnak az EMT kiváltásához vese tubulus sejtekben. Az ECM metabolizmusának egyik központi szabályozója a Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), s e molekula igen fontos szerepet játszik a szöveti fibrózis, így vesefibrózis patogenezisében. Mindezek miatt megvizsgáltuk, hogy mely jelátviteli rendszerek járulnak hozzá a PAI-1 promóter transzkripció aktivitásának fokozásához vese tubulus sejtekben. Kimutattuk, hogy az angiotenzin II (AngII) AT1 receptorát stabilan expresszáló tubulus sejtekben az AngII dózisfüggő módon fokozta a promóter aktivitást, míg a más rendszerekben hasonló hatású angiotenzin IV nem befolyásolta a PAI-1 promótert. Az AngII ezen hatását sem az ERK kaszkád, sem a c-Jun-N-terminal Kinase (JNK) rendszer gátlásával nem tudtuk kivédeni. A tirozin kinázokat specifikusan átló genistein ugyanakkor nagymértékben csökkentette az AngII hatására létrejövő promóter aktiválódást. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a tubulus sejtek géntranszkripció folyamatainak szabályozásában a tirozin kinázok is fontos szerepet játszanak.

#### Egy kóros pozitív feed-back kör lehetősége a RAS szabályozásában

Egy további vizsgálatsorozatban a szöveti fibrózis progressziójában potenciálisan fontos szerepet játszó lokális renin-angiotenzin rendszerek szabályozásának molekuláris részleteit vizsgáltuk. Ezen kísérleteinkben kimutattuk, hogy a renin transzkripció szabályozásának egyik eleme, a proximális renin promóter proximális tubulus sejtekben AngII hatására paradox módon aktiválódik. E paradox hatás molekuláris mechanizmusát vizsgálva azt találtuk, hogy az AngII ezen hatását részben a JNK közvetíti, míg az AngII által szintén aktivált ERK nem vesz részt a proximális renin promóter transzkripció aktivitásának

fokozásában. Az AngII renin promóterre kifejtett hatása független volt a protein kináz C rendszertől is, ugyanakkor a tirozin kinázok gátlása részlegesen kivédte az AngII hatását. Kísérleteinkben azt is igazoltuk, hogy a tirozin kinázok és a JNK feltehetően hierarchikus rendszerbe szerveződnek e hatás közvetítéséhez, s e rendszerben a tirozin kinázok (más rendszerekhez hasonlóan) „upstream” helyezkednek el a JNK-hoz képest. Eredményeink alapján felvetettük, hogy bizonyos esetekben az AngII renin transzkripcióra kifejtett negatív feed-back hatásáért elsősorban felelős, a transzkripciós starthelytől távoli modulátor szekvenciák gátlás alá kerülhetnek, s ilyen esetekben az AngII a proximális promóteren hatva paradox módon fokozott renin transzkripciót indukálhat, mely egy kóros pozitív feed-back szabályozás molekuláris alapját képezheti.

### **A Discoidin Domain Receptorok tanulmányozása vese tubulus sejtekben**

A DDR1 és a DDR2 receptorok a tirozin kináz receptorok családjába tartoznak, s specifikus ligandjuk a fibrilláris kollagén. A kollagén által stimulált DDR receptorok szerepet játszhatnak a progresszív vesefibrózis patomechanizmusában. Kísérleteinkben először azt akartuk tisztázni, hogy kimutathatók-e a discoidin domain receptorok (DDR) vese tubulus sejtekben, illetve azt, hogy milyen stimulusokra reagálnak. Vizsgáltuk továbbá a DDR és a TGF közötti lehetséges kapcsolatot is.

Az általunk használt sertés proximális tubulus sejtekben a DDR1 receptorok jelenléte kimutatható volt, míg a DDR2 receptorok jelenlétét nem tudtuk igazolni. Ezt követően a tubulus sejteket TGF-fel I. típusú kollagénnel, gelatinnal vagy hőinaktivált kollagénnel kezeltük. A DDR receptorokat immunprecipitáltuk, majd a receptor fehérjék tirozin foszforiláltságát Western blot segítségével elemeztük. A DDR1 receptorok tirozin foszforiláltságát az I. típusú kollagén fokozta, míg gelatin vagy hő-inaktivált kollagén nem befolyásolta. A receptor tirozin foszforiláció igen lassú kinetikát mutatott: fokozott foszforiláció legkorábban 4 órás inkubáció után volt kimutatható, s a maximális foszforiláció 24 óra múltán volt látható. A sejtek tartós TGF kezelése mellett a DDR1 receptor fehérje mennyisége csökkent.

Eredményeink alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a DDR1 szerepet játszhat a progresszív vesefibrózis kialakulásában.