

T 042672 OTKA zárójelentés

A syndecan és decorin proteoglikánok kóros szerepének modellezése májbetegségekben.

A 4 éves kutatási projekt fő célja az volt, hogy olyan modellrendszereket hozzunk létre, melyek segítséget nyújtanak két proteoglikán, az extracelluláris decorin és a sejtfelszíni syndecan-1 májbetegségekben betöltött szerepének vizsgálatára. A vizsgálatokat az indokolta, hogy emberi májcirrrosisban és májrákban a két proteoglikán viselkedése ellentmondásos volt..

- A cirrhotikus májakban a decorin expressziója nagymértékben fokozódott, ami ellene szólt annak a feltételezésnek, hogy a decorin véd a TGFβ1-fibrózist fokozó hatásával szemben. Cirrhosisban fokozódik a hepatocyták syndecan expressziója is.
- Cirrhosis nélküli májrákokban a decorin és a syndecan expressziója csökken
- Cirrhosisal előforduló daganatokban a tumorszövet bőségesen tartalmazott syndecan és decorint.

Az utóbbi két megfigyelés arra utal, hogy a cirrhosisal szövődött tumorok magas proteoglikán expressziója a fibrogenézissel és nem a tumor kialakulásával kapcsolatos. Ezek mellett tovább folytattuk azokat a vizsgálatokat, melyek a proteoglikánok daganatokban betöltött szerepét próbálják tisztázni.

Három modellrendszert dolgoztunk ki:

1. Cirrhosis és májrák létrehozása és decorin $-/-$, TGFβ1 $+/-$ és decorin $-/-$, TGFβ1 $+/-$ kettős transzgen egereken.
2. Syndecan-1 transzgen egér létrehozása albumin promóteres vektorral, mely csak a májban termeli fokozottan a syndecan-1-et. Cirrhosis és májrák létrehozása.
3. A syndecan-1 fehérje és csonkolt mutánsaival transzfektált hepatóma vonalak a syndecan-1 biológiai hatásának tanulmányozására.
4. A vázolt modellek mellett folyamatosan vizsgáltuk, hogy más heparánszulfát proteoglikánok expressziója hogyan változik májrákokban és azt is hogy hogyan változik a syndecan expressziója a szájüregi rákokban.

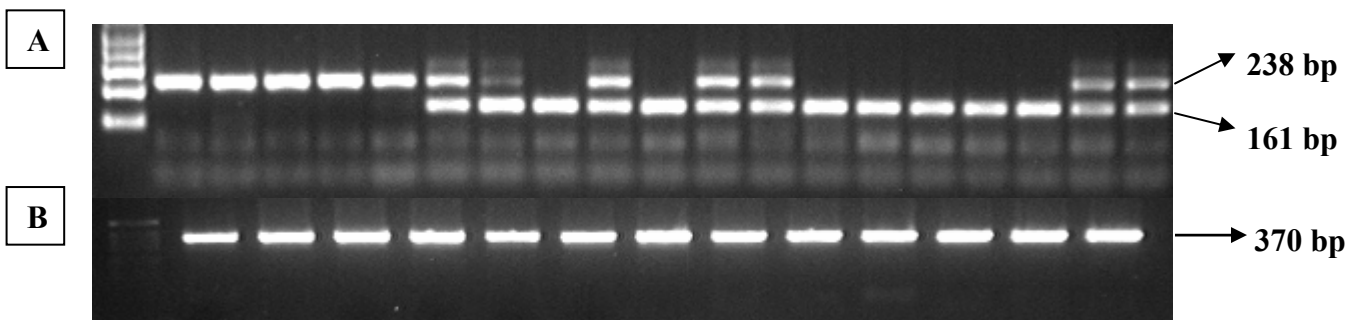
I. Cirrhosis és májrák indukciója transzgén egerekben.

A kötőszövet felszaporodás számos krónikus betegség jellegzetes vonása. A kialakuló fibrózis a szövetek pusztulását idézi elő. E betegség talaján lényegesen megnövekszik a májrák kialakulásának valószínűsége is. A fibrogenézis gátlása ezekben az esetekben a betegség kezelésének meghatározó tényezője lehetne. Ismereteink szerint a kötőszövet felhalmozódás fő stimulátora a TGF- β 1, ezért számos kutatás célja e molekula semlegesítése. A decorin egy kis ECM proteoglikán, mely két ponton is szabályozza a kötőszövet proliferációját. A kollagénekhez kapcsolódva gátolja a kötőszöveti rostok érését, valamint in vitro köti és hatástalanítja a TGF- β 1-et. A karcinogenezis folyamata során a decorint, mint tumorsuppresszort írták le, míg a TGF- β 1 promóter és védő szerepet egyaránt betölthet. Vesefibrózisban a decorin védő hatását bizonyítani tudták. Korábbi vizsgálataink alapján azonban úgy tűnik, hogy májcirrhosis esetén a decorin nem rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. A kérdés eldöntésére állatmodellt hoztunk létre.

Egértörzsek kialakítása:

1. **Decorin knock out egerek ($dec^{-/-}$):** Dr. Renato V. Iozzo úrtól (Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) 4 db C57Bl6 heterozigóta decorin ko egér érkezett hozzánk. Ebből homozigóta ko törzs került kialakításra.
2. **TGF- β 1 transzgén egerek (TGF- β 1 $^{+}$):** E BCBA abl/TGF- β 1 törzset eredetileg Snorri S. Thorgeirsson és munkatársai hozták létre. (Laboratory of Experiental Carcinogenesis, Center for Cancer Research, (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Az egerekben az aktív sertés TGF- β 1 transzgént albumin promóter mögé klónozták, így túlermelése a májra korlátozódik. A transzgén az Y kromoszómán található, így kísérleteinkben csak hím egyedeket használunk. A törzs intézetünkben dr. Nagy Péter révén rendelkezésünkre állt.
3. **Kettős transzgén egerek ($dec^{-/-}$ /TGF- β 1 $^{+}$):** a fent említett két törzs keresztezéséből alakítottuk ki kettős transzgén egereinket, melyek az inaktív decorin gén mellett a TGF- β 1 transzgént is hordozzák.

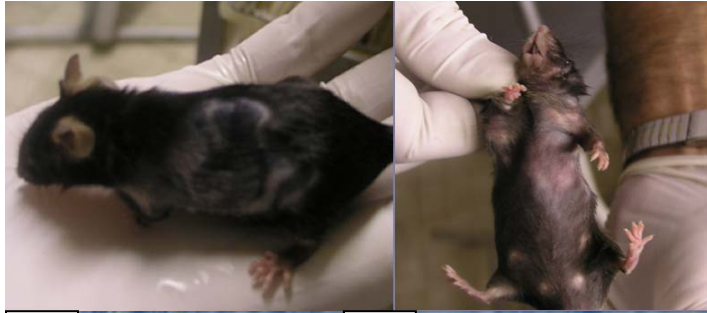
Az egerek géntípusát farokból izolált DNS PCR vizsgálatával határozzuk meg. Az ezt követő gélelektroforézis képen jól elkülöníthető az egyes egyedek genotípusa. (1. ábra.) Homozigóta decorin ko egerek esetén csak 238 bp-nál, vad típus esetén csak 161 bp-nál, heterozigóta állatoknál mindkét helyen kapunk terméket. (1./A. ábra). TGF- β 1 transzgén állatokban 380 bp-nál kapunk terméket.



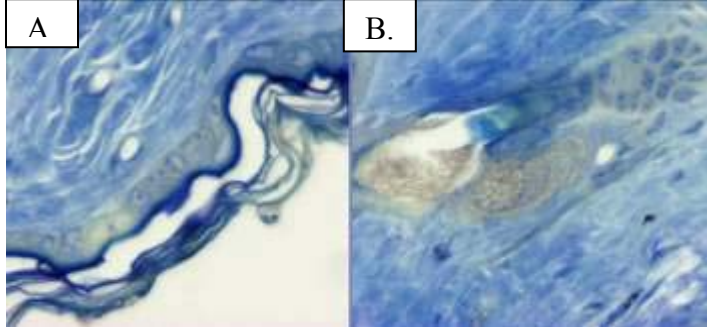
1. ábra. Az egerek genotípus meghatározására készült gélelektroforézis. A: Decorin PCR termékek. , B: TGF- β 1 PCR termékek.

Kontroll csoportok vizsgálata:

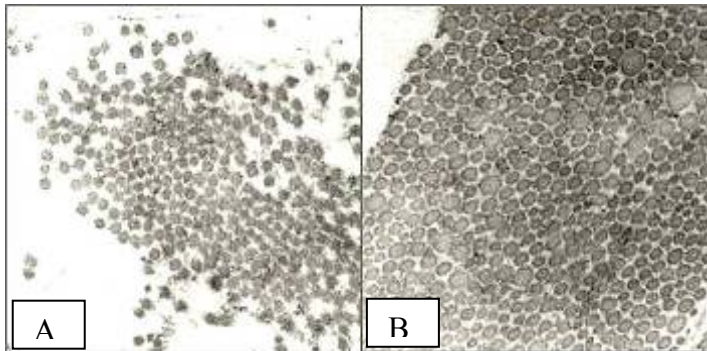
Külső megjelenés:



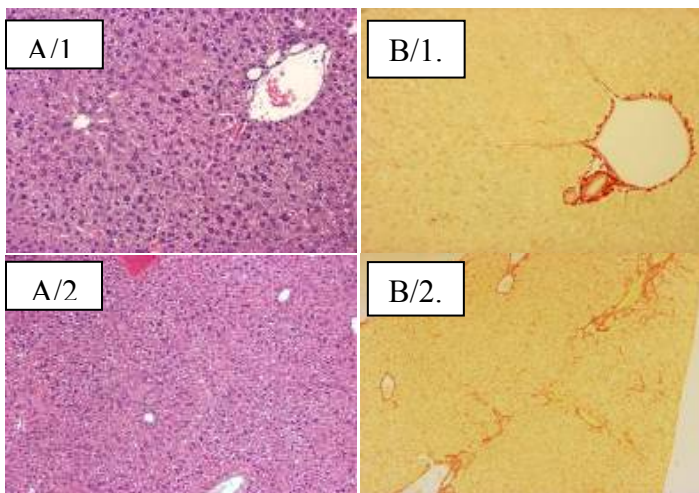
2. ábra. A $dec^{-/-}$ és $dec^{-/-}/TGF-\beta 1^{+}$ egerek külső megjelenése. Jellemző a nagy kiterjedésű szőrhiányos területek megjelenése.



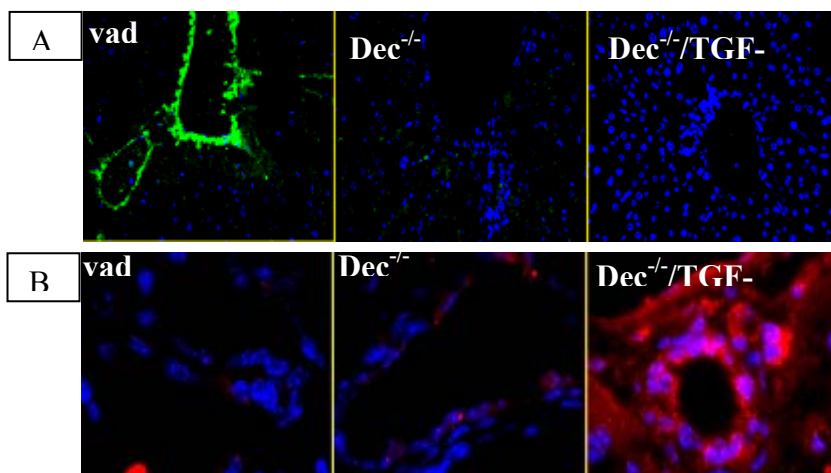
3. ábra. A bőrből készült félvékony metszetek mikroszkópos felvételei. (fénymikroszkóp, 40X nagyítás). Az epidermisz egyetlen sejtsorból áll, a szőrszál beletörik a tüszőbe.



4. ábra. Az állatok bőréből készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek. 180-szoros nagyítás. A: vad típus: a kollagén rostok átmérője egyenletes B: KO típus: hatalmas (körök), és igen kis átmérőjű rostok (nyilak) egyaránt megtalálhatóak.



5. ábra. Az egyedek májából készült metszetek. A.: HE festett metszetek. Fénymikroszkópos felvételek. A/1: $dec^{-/-}$ 20X; A/2: $dec^{-/-}/TGF-\beta 1^{+}$ májmetszet 10X. B.:PS festés májmetszeteken. Fénymikroszkópos felvétel 10X nagyítás. B/1: $dec^{-/-}$ típus, B/2: $dec^{-/-}/TGF-\beta 1^{+}$ típus, ahol spontán fibrózis látható.



6. ábra. A genetikai módosítások fehérje szinten való vizsgálata immunhisztokémiával (fluoreszcens mikroszkóp).

A: Decorin immunhisztokémia (10X). Csak a vad típus esetén pozitív a reakció. Inaktív gén esetén nincs fehérjetermék.

B: TGF-β immunhisztokémia (100X). Az overexpresszálo kettős transzgén egerekben jóval erősebb a reakció, mint a transzgént nem hozdozó egyedekben.

Fibrogenesis és regeneráció:

Az állatok ivóvizéhez 150 mg/l-es végkoncentrációban tioacetamidot (TA) adagolunk 4 hetes koruktól kezdve. A betegség előrehaladtát 1, 2, 3, 4 és 7 hónap kezelés után vizsgáltuk, minden időpontban az 5 genotípusból 3-3 biológiai párhuzamossal. A gyógyulási folyamat detektálásához az állatokat 4 hónapig kezeltük, majd a TA elhagyása után 1, 2, 3 és 4 hónappal vizsgáltuk a betegség regresszióját.

Hepatokarcinogenesis:

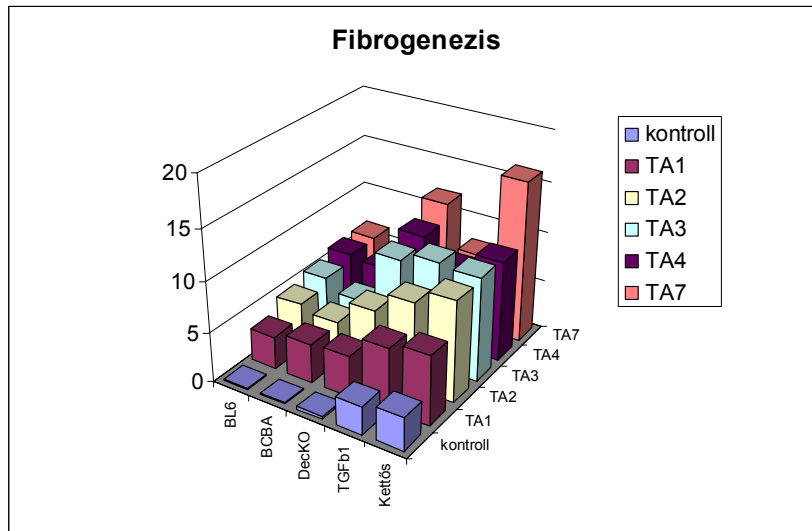
Mind cirrhotikus májban, mind nem-cirrhotikus májban vizsgáltuk a hepatokarcinogenesis folyamatát. Előbbinél 7 hónapig alkalmaztuk a TA kezelést. A nem-cirrhotikus májban történő tumorképződés dietil-nitrozaminnal (DEN) indukáltuk. Az állatokat 15 napos korukban intraperitoneálisan 10 µg/testsúly (g) koncentrációjú dietil-nitrozaminnal oltottuk, majd 9 hónap múlva vizsgáltuk az állatok máját.

Eddigi eredmények:

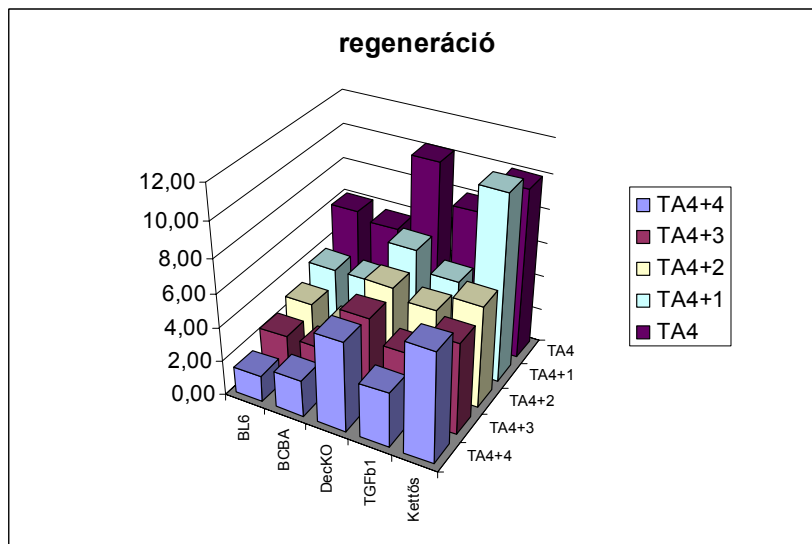
1. Fibrogenesis és regeneráció:

A betegség nyomon követése során a kötőszövet felszaporodását fehérjeszinten morfometriával, immunhisztokémiával, Génexpressziós szinten real-time RT-PCR-rel, fehérje-degradáció szempontjából pedig zselatináz-tesztel vizsgáltuk.

A. A morfometria eredményei:



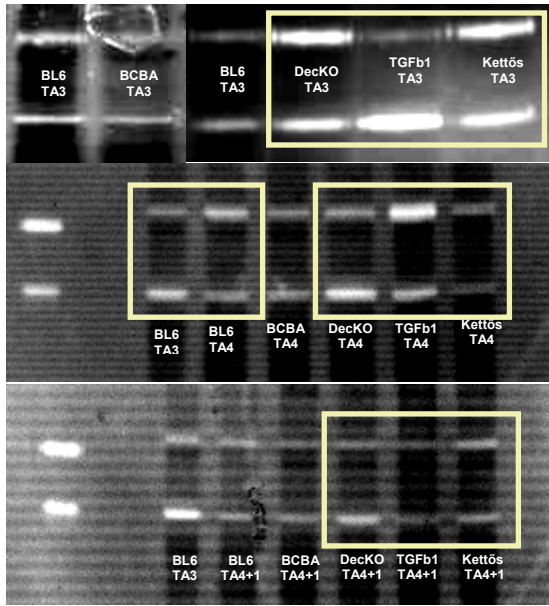
7. ábra. Fibrogenézis. A betegség a vad, dec^{-/-}, TGFβ1⁺, dec^{-/-}/TGF-β1⁺ sorrendben súlyosbodott. A legsúlyosabb fibrózist a dec^{-/-}/TGF-β1⁺ májakban találtunk. A vad típusú és TGF-β1⁺ csoportokban már 4 hónap után a kezelés ellenére gyógyulás tapasztalható, míg a két decorin KO törzsben továbbra is igen magas a kötőszövet mennyisége. A legsúlyosabb fibrózist 7 hónap után a dec^{-/-}/TGF-β1⁺ csoportban figyelhető meg.



8. ábra. Regeneráció. A TGF-β1⁺ és kontroll mintákban már 4 hónap után gyógyulás figyelhető meg, majd 1 hónappal a kezelés abbahagyása után további csökkenés tapasztalható. A dec^{-/-} és dec^{-/-}/TGF-β1⁺ csoportban a gyógyulás nem olyan kifejezett, és még 4 hónap után is magas a kötőszövet mennyisége a kontrollhoz képest.

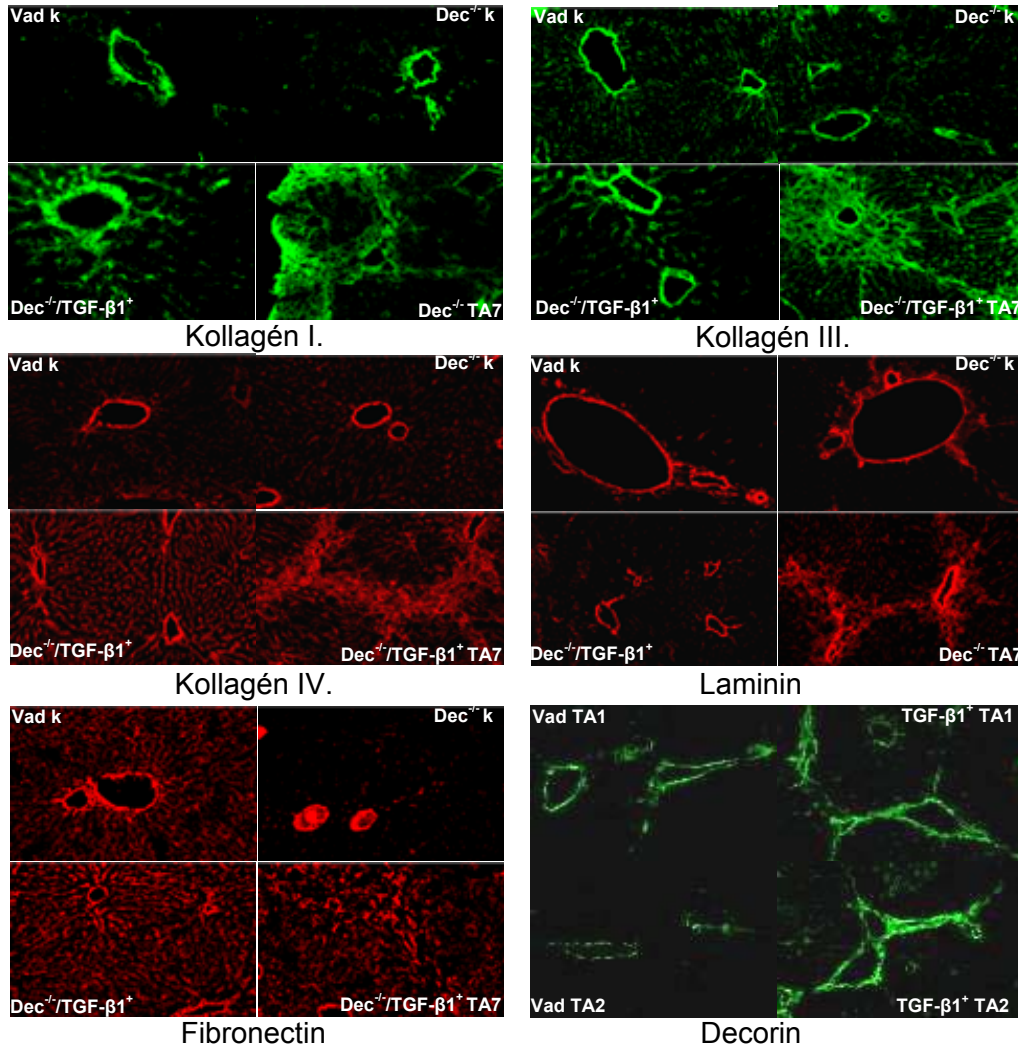
B. A mátrixfehérjék degradációjának vizsgálata (zselatináz-teszt):

Mivel az aktuális kötőszövet mennyiségét nemcsak a fehérjék képződése, hanem a lebomlásuk sebessége is befolyásolja, elvégeztük a mátrix-metalloproteináz (MMP) 2 és 9 aktivitásának vizsgálatát.



9. ábra. Zselatináz-teszt. A vizsgálat során megfigyeltük, hogy a TGF- β 1+ csoportban 3 hónap kezelés után az MMP-9 csökkent mennyiségben van jelen a többi csoporthoz képest. 4 hónap után mind a vad típusban mind a TGF- β 1+ csoportban megfordult az MMP-k aránya, az MMP-9 javára. Az MMP „switch” a dec-/- mintákban is megfigyelhető, de ellentétes irányban. A dec-/-/TGF- β 1+ májakban erős csökkenés figyelhető meg az előző hónaphoz képest. A kezelés után 1 hónappal a decorin génnel rendelkező csoportokban gyengébb, míg a két KO törzsnél erősebb jelet tapasztaltunk.

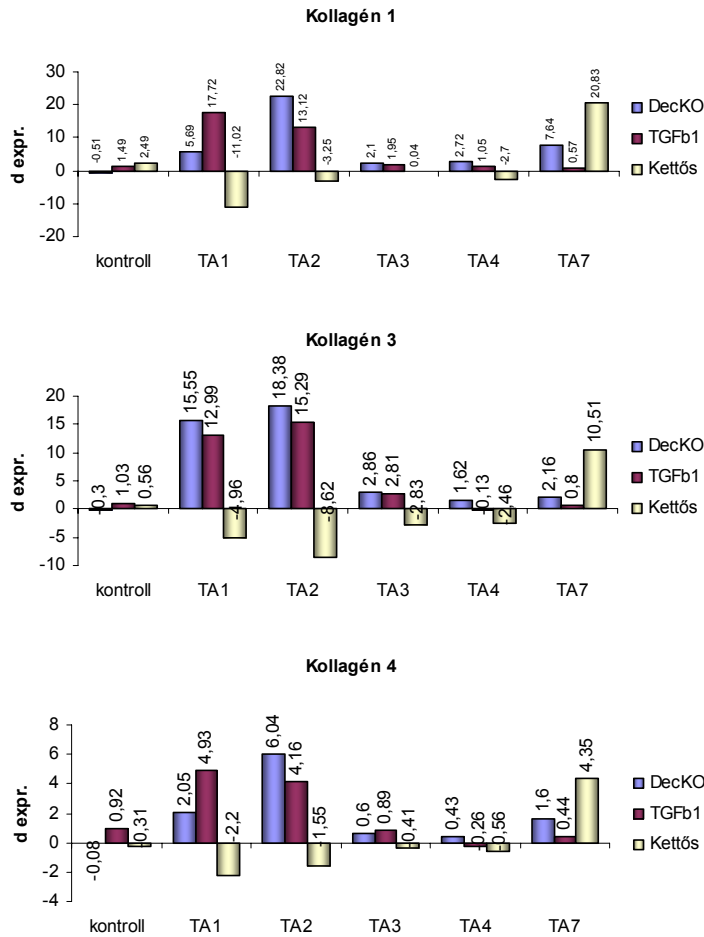
C. Immunhisztokémia:



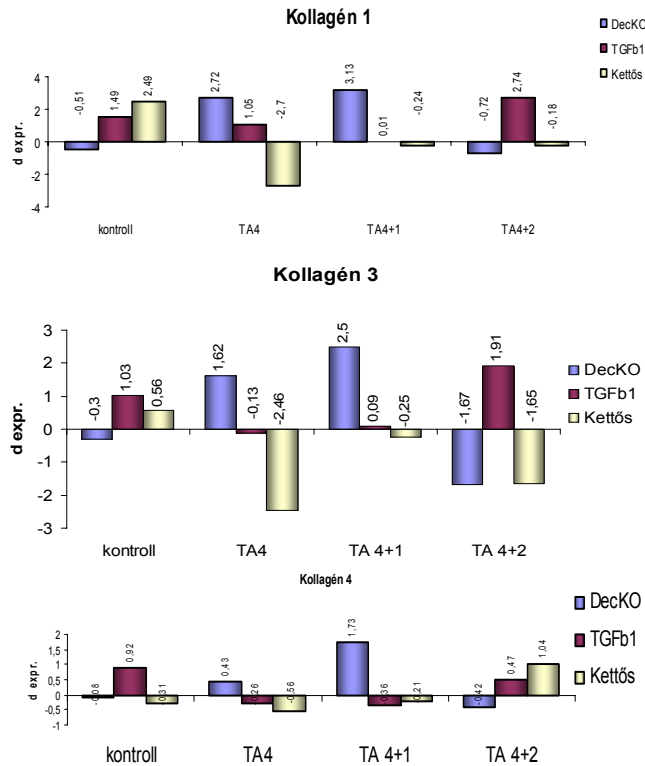
10. ábra. Immunhisztokémia

A kollagén I, III, és IV mennyisége a dec-/-/TGF-β1+ kontroll csoportban a spontán fibrózis miatt magasabb volt a többi genotípushoz képest. Kevesebb fibronectin látható a dec-/- kontroll csoportban. Kezelés hatására e fehérjék mennyiségi növekedése tükrözte a morfometria eredményét, egyedül a fibronectin mennyisége nem változott (1-1 képpel illusztrálva). A decorin gént tartalmazó csoportokban e fehérje mennyisége több a TGF-β1+ egyedekben, mint a vad típusúakban. (Fluoreszcens mikroszkóp 10X).

D. A real-time RT PCR eredményei



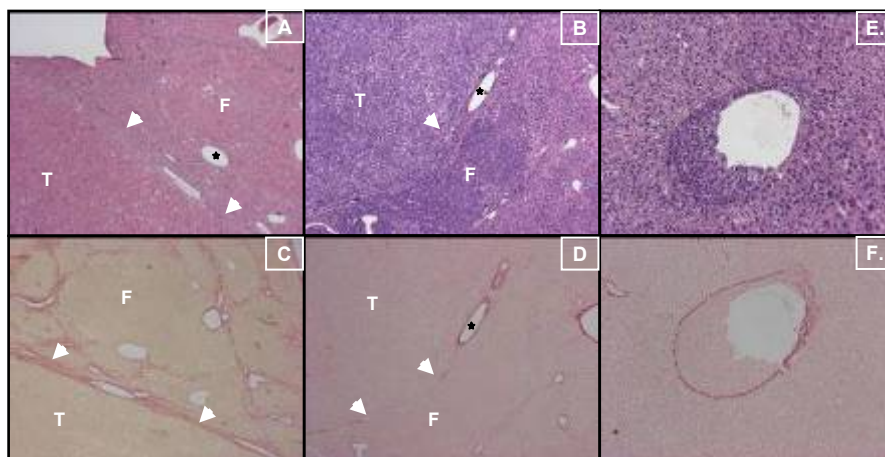
11. ábra. A fibrogenézis során mért kollagén I, III, IV génexpressziók. Magasabb kollagén expressziót tapasztaltunk a kezeletlen TGF-β1+ és dec-/-/TGF-β1+ egereknél, amit a spontán fibrózis okoz. 1 hónap kezelés után a dec-/- és TGF-β1+ mintákban ugrásszerűen megnőtt mindhárom vizsgált kollagén expressziója. A kollagén I és IV esetében a TGF-β1+ májokban mértünk magasabb értékeket. 2 hónap után az expresszió-értékek tovább növekedtek, mindhárom mátrixfehérjénél a dec-/- mintákban mutatták a legmagasabb értéket. 3 és 4 hónap után folyamatosan csökkenő expressziót mértünk. A dec-/-/TGF-β1+ mintákban 1-4 hónap után is a kontrollhoz képest igen alacsony értékeket mértünk. 7 hónap után a dec-/- és dec-/-/TGF-β1+ mintákban ismét növekedés tapasztalható.



12. ábra. A regeneráció során mért kollagén I, III, IV génexpressziók. 4 hónapig tartó kezelés után 1 hónappal a TGF-β1 transzgén egereknél (csak úgy, mint a vad típusúaknál) csökkenés tapasztalható a kollagén I expressziójában, míg a két decorin KO törzsnél további emelkedés jelentkezett. A TGF-β1+ csoportnál 2 hónap után az expressziós értékek körülbelül megegyeznek a kontrollnál mért értékekkel. A dec-/-csoportban erős csökkenés figyelhető meg mindhárom kollagén esetében, míg a dec-/-/TGF-β1+ mintákban a kollagén I expresszió nem változott, a kollagén III-é csökkent, a kollagén IV mRNS mennyisége pedig jelentősen megemelkedett.

2. Hepatokarcinogenezis:

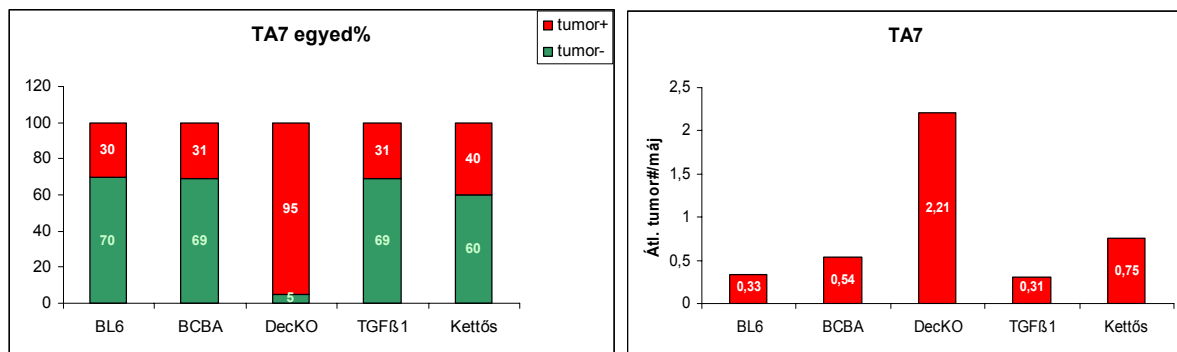
Az ötféle különböző genotípusú csoportban megvizsgáltuk az egyes csoportokon belül azon egyedek arányát, melyekben makroszkopikus tumorok alakultak ki. Immunhisztokémiával néhány, a decorin és a TGF-β1 jelátvitelében fontos fehérje mennyiségét illetve lokalizációját mutattuk ki. A kétféle karcinogénnel indukált tumorok a genotípustól függetlenül is eltérnek morfológiailag.



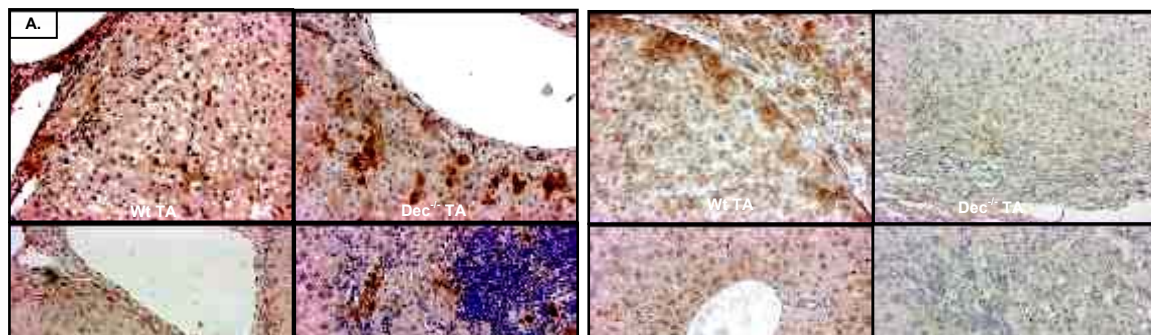
13. ábra. A TA és DEN indukált tumorok között megfigyelt különbségek. (F: fókus, T: tumor, nyilak: tumor határa, *: azonos erek lumene)

- TA indukált tumor (HE festés). A tumorsejtek gazdag citoplazmájúak viszonylag kis maggal, és erősen eozinofilok.
- DEN indukált tumor. A tumorsejtekre magas nukleusz/citoplazma arány és bazofil festődés jellemző.
- és D. PS festések. A TA-indukált tumorokra (C) jellemző a kötőszövetes tok, mi nem-cirrotikus májban ez ritkán fordul elő.
- és F. A DEN-kezelt májokban a tumorsejtekből álló fókuszok gyakran az erekben lumenében jelennek meg.

A. TA-indukált hepatokarcinogenezis:



14. ábra. 7 hónap TA kezelés után a dec^{-/-} csoportban volt a legtöbb egyed, amiben makroszkópos tumorok alakultak ki, és ezekben volt a legmagasabb az egy májra eső átlagos tumorszám is. A kontroll és TGF-β1⁺ csoportok között nem volt különbség, míg a kettős transzgén állatokban valamivel magasabb volt mind a két érték a kontrollhoz képest.

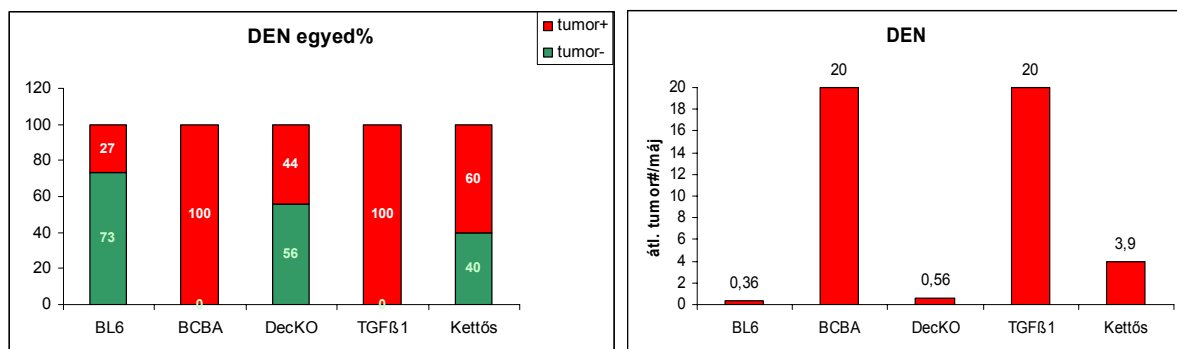


15. ábra. Immunhisztokémia.

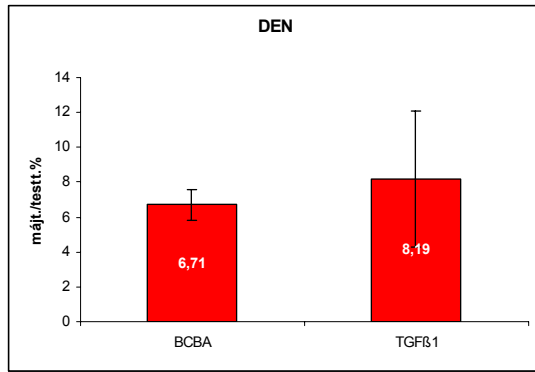
A. Aktív ERK1/ERK2 detektálása TA indukált tumorokban. A pozitívitas a TGFβ1⁺, vad, dec^{-/-}/TGFβ1⁺ és dec^{-/-} sorrendben erősödik. A decorin gén hiánya erősödő pozitívítást okoz.

B. Aktív p38 immunhisztokémia. Az intenzitás a vad, TGFβ1⁺, dec^{-/-}/TGFβ1⁺, dec^{-/-} sorrendben erősödik. A decorin gén megléte okoz erős pozitívítást.

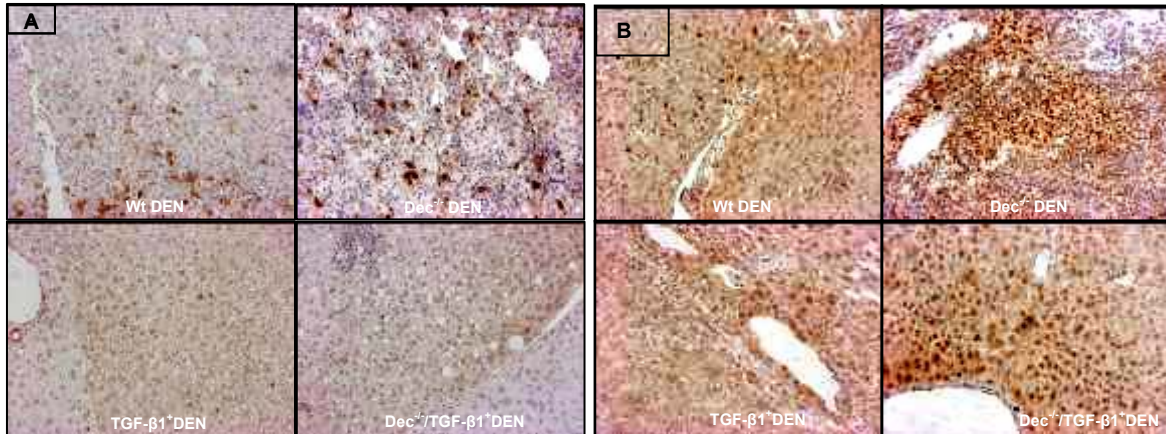
B. DEN-indukált hepatokarcinogenezis:



16. ábra. DEN oltása után 9 hónappal a TGFβ1⁺ csoportban volt a legsúlyosabb a betegség, bár a BCBA alaptörzs eleve érzékenyebbnek bizonyult. A BL6 vonalon a betegség súlyossága a vad, dec^{-/-}, dec^{-/-}/TGFβ1⁺ sorrendben nőtt.

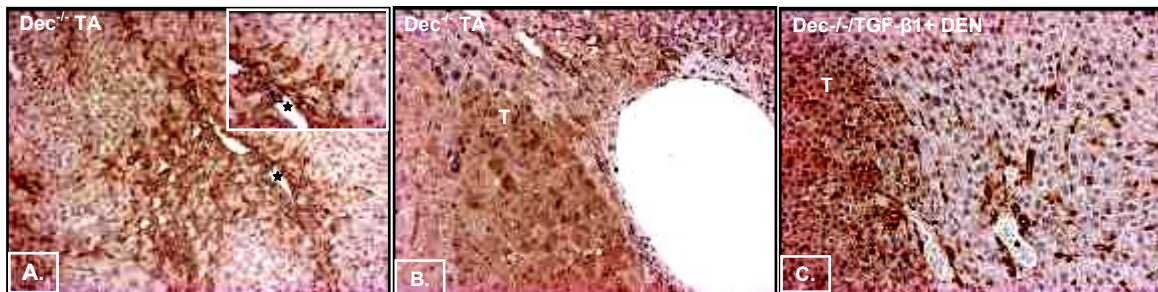


17. ábra. Májútömeg/testtömeg arány a két BCBA alapú törzsnél. BCBA egérvonal eleve érzékenyebbnek bizonyult. A súlyosabb megbetegedés azonban mindenképpen kapcsolható a növekedési faktor túltermeléséhez, ahogy azt a nagyobb májtömeg mutatja a BCBA alaptörzshöz képest.



18. ábra. Immunhisztokémia.

A. Aktív ERK1/ERK2 detektálása DEN indukált tumorokban. A pozitívítás a $dec^{-/-}/TGF-\beta 1+$, $TGF-\beta 1+$ vad, $dec^{-/-}$ sorrendben erősödik. A növekedési faktor túltermelése az inaktív ERK mintázatához hasonlít.
B. Aktív p38 immunhisztokémia. A jel erőssége a TA-indukált tumoroknál megfigyelt sorrend ellenkezőjét mutatja. A pozitívítás erősebb a decorin génnel nem rendelkező tumorokban.



19. ábra. Az inaktív ERK1/ERK2 immunhisztokémia.

Nem tapasztaltunk különbséget sem az egyes genotípusok, sem a különböző eredetű tumorok között.

- A. cirrhotikus májban a kötőszöveti sejtek, a fibroblasztok és endotél sejtek pozitívak.
- B. és C. TA és DEN indukált tumorok esetében a tumorsejtek pozitívak.

Megbeszélés:

Az egértörzseink eltérően reagáltak a kezelésekre attól függően mennyi decorin illetve TGF- $\beta 1$ fehérjét termel a szervezetük. A kezelés első két hónapja után a fibrózis súlyossága a vad, $dec^{-/-}$, $TGF-\beta 1+$ és $dec^{-/-}/TGF-\beta 1+$ sorrendben növekedett, melyet morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálataink támasztanak alá. A kollagén I, III, IV mRNS mennyiségi változásait real-time RT-PCR segítségével vizsgáltuk. Érdekes, hogy a kollagén mRNS-szintek nem egyeznek a fehérje szinten mért mennyiségekkel. Erre az egyik lehetséges magyarázat, hogy a fokozott fehérje-termelés miatt „elhasználják” az mRNS készletüket.

Mivel a fehérjék mennyiségét a transzkripció aktivitáson kívül egyéb tényezők, pl. a degradáció befolyásolhatja, így a mátrixbontó enzimek (MMP9 és MMP2) aktivitását is vizsgáltuk zselatináz-teszttel. Ebben szintén adódtak különbségek az egyes genotípusok között. 7 hónap kezelést követően a betegség a vad, TGF- β 1+, dec-/-, dec-/-/TGF- β 1+ sorrendben súlyosbodott. A betegség gyógyulása során a decorin hiánya késleltette a regeneráció folyamatát. A decorin génnel rendelkező csoportokban úgy tűnik a betegség visszahúzódik, ennek háttéréről egyelőre nincsenek adataink. Az, hogy a decorin mennyisége a növekedési faktor hatására fokozódott a fibrogenézis során TGF- β 1+ állatokban a vad típusal összehasonlítva az a két fehérje kapcsolatát bizonyítja. A decorin hiánya önmagában is súlyosbította a fibrózis kialakulását a knock out állatokban. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a decorinnak fontos szerepe van a máj fibrogenézisében illetve gyógyulási folyamatban is.

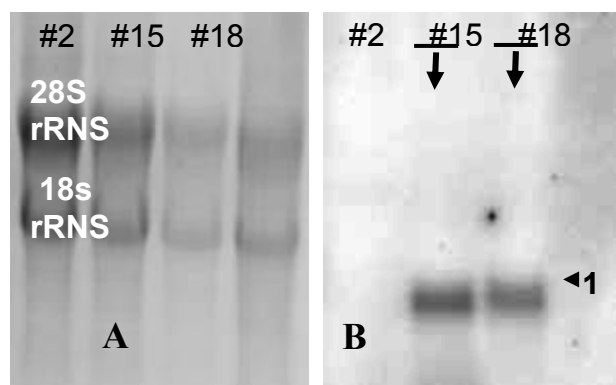
A karcinogenezis során teljesen eltérő eredményeket kaptunk az alkalmazott karcinogéntól és az egerek genetikai háttérétől függően. A cirrhotikus májakban kialakuló karcinogenezis során a legtöbb tumort a Dec-/- állatokban figyeltük meg, míg a TGF- β 1+ egerek a DEN indukált karcinogenezisre bizonyultak érzékenyebbnak. Ez arra enged következtetni, hogy az alkalmazott karcinogéntól függően a tumorigenezisnek már az első lépésektől különböznie kell. A vizsgált aktív jelátviteli molekulák mennyiségében és lokalizációjában is tapasztaltunk különbségeket a genetikai háttértől és a tumor típusától függően.

Eredményeink szerint mind a decorinnak, mind a TGF- β 1-nek igen fontos szerepe van a hepatokarcinogenezis során, de szerepük erősen függ az alkalmazott karcinogéntól. Azonban a mögöttes mechanizmusok jobb megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.

II: Májban kifejeződő Syndecan-1 transzgén egér létrehozása

Ezt a munkát a KOKI transzgén laboratóriuma vállalta.

2006 végén két transzgenikus vonalban sikerült a humán syndecan-1 1kb méretű messenger RNS-ét kimutatni.



1. ábra. Humán szindekán-1 mRNS kimutatása a transzgenikus vonalakban.
A: RNS gél etidium bromiddal festett képe.
B: Northern hibridizáció P³²-vel jelölt humán szindekán-1 próbával.

Sajnos ezek közül csak az egyik vonal #15 bizonyult szaporodóképesnek.

Annak igazolását, hogy az egérmájak a humán fehérjét is termelik már saját laboratóriumunkban végeztük..

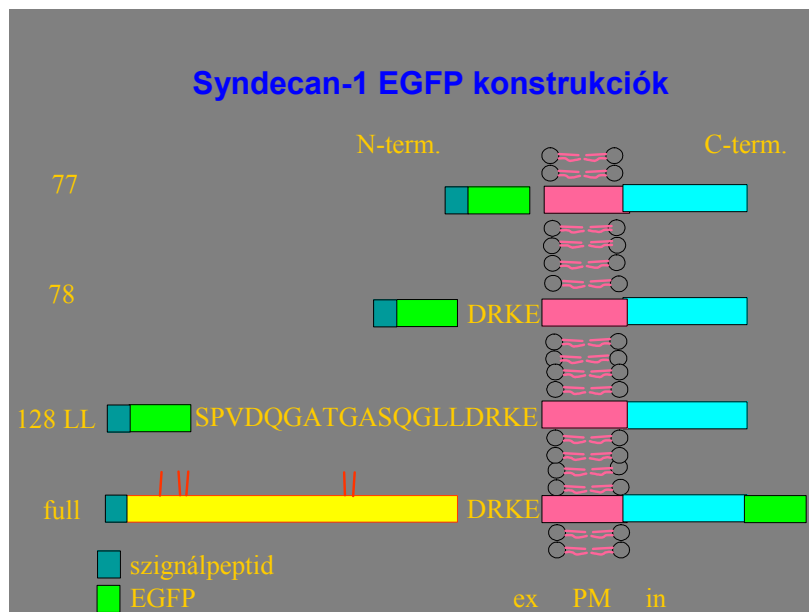
A vizsgálatok során szembetaláltuk magunkat azzal a nehézséggel, hogy a humán syndecan-1 extracelluláris doménjét felismerő ellenanyagot egérben termelték, ezért a másodlagos anti-egér ellenanyag diffúzan reagált az egér májjal.

Így sem immunhisztokémiával, sem ELISA-val, sem Western blottal nem jutottunk információhoz. A poliklonális anti syndecan ellenanyag felismeri az egér syndecan-1-et is tehát ez sem használható. Számos megközelítéssel próbálkoztunk a probléma kiküszöbölésére,

ezért a zárójelentés végéig nem sikerült kísérletekre alkalmas állatokhoz jutnunk. Jelenleg a munka ott tart, hogy immuncitokémiával sikerült igazolnunk a humán syndecan-1 fehérje jelenlétét az egerek májában és megkezdjük a májából a proteoglikán izolálását Western-blot vizsgálathoz. Természetesen a kísérletet szándékunkban áll elvégezni, amennyiben a Western blot megerősíti a humán fehérje jelenlétét a májban.

III. A syndecan-1 fehérje és csonkolt mutánsaival transzfektált hepatóma vonalak kialakítása a syndecan-1 biológiai hatásának tanulmányozására.

Plazmidkonstrukciók létrehozása



Több plazmidkonstrukciót hoztunk létre EGFP expressziós vektorba épített cDNS fragmentumokkal. Ezek szerkezete látható a ..ábrán.

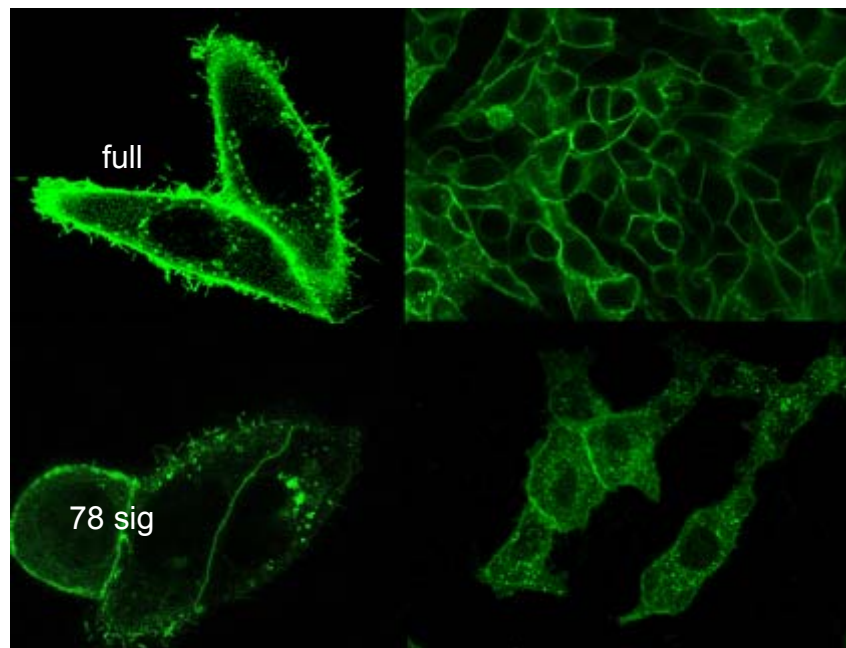
Plazmidkonstrukcióink sejtbe juttatásához két különböző transzfektáló rendszert alkalmaztunk. A hepatóma vonalak EGFP konstrukciókkal történő transzfektálásához az Effectene (Qiagen) rendszer bizonyult a leghatásosabbnak, melynek metodikáját sikerült úgy beállítani, hogy konstrukcióktól függően 10-80 % hatékonyságot értünk el. A FuGene6 rendszer (Roche) kb. 5-10 % transzfekeciót eredményezett.

A fullHS1.pEGFP konstrukciónál a transzfektálás hatékonysága 70%-os, a csonkolt verzióknál 30%-os volt. Az üres pEGFP vektorral 80%-os transzfektálást értünk el, hasonló eredményt kaptunk az RMKKK.pEGFP konstrukció esetén.

Stabil transzfektánsok kialakítása

A pEGFP plazmidban található G418 rezisztenciagén nyomán stabilan transzfektált sejt vonalakat alakítottunk genecicin 350 ng/ml - 800ng/ml emelkedő dózis hozzáadásával. A stabil transzfekeció során az egyenletesen és intenzíven zöld klónokat szaporítottuk tovább, részben úgy, hogy ezeket a tenyésztőedényről felszedtük, részben pedig áramlási citométer segítségével választottuk el (szorterezttük).

A vektorok által kódolt fehérjék lokalizációja



1.ábra: A syndecan-1 full és 78-as konstrukció kifejeződése az EGFP fluoreszcencia alapján. Bal oldalon az átmeneti, job oldalon a stabil transzfektánsok képe.

A HepG2 és Hep3B sejtekben a vektorok által kódolt fehérjék lokalizációja teljesen azonos volt. Az üres EGFP vektor használatakor a zöld fluoreszcens fehérje diffúzan volt megtalálható a sejtekben. A full és a 78-as exportszignállal rendelkező konstrukciók termékei a Golgi apparátusban és a sejtfelszínen jelentek meg, a vártak megfelelően, tehát a vélt exportáló szignál szekvencia valóban működik. Ugyanakkor a 77 konstrukcióról átírt fehérje intracitoplazmatikus lokalizációban maradt. A sejtfelszíni expresszió különösen a sejtek összefekvő felszínein volt kifejezett. Ez a lokalizáció teljes mértékben megfelel a vad syndecan-1 lokalizációjának (1.ábra).

A tartós transzfektánsok tulajdonságai

Gyakorlatilag minden konstrukciónkkal sikerült tartós transzfektánsokat kialakítani. Ez annál inkább bír jelentőséggel, mivel ismereteink szerint funkcionáló kiméra syndecan eddig senkinek sem sikerült létrehozni. A túltermeltetett syndecan-1 fehérje az extracelluláris domént felismerő monoklonális ellenanyaggal vizsgálva megőrizte antigenitását .

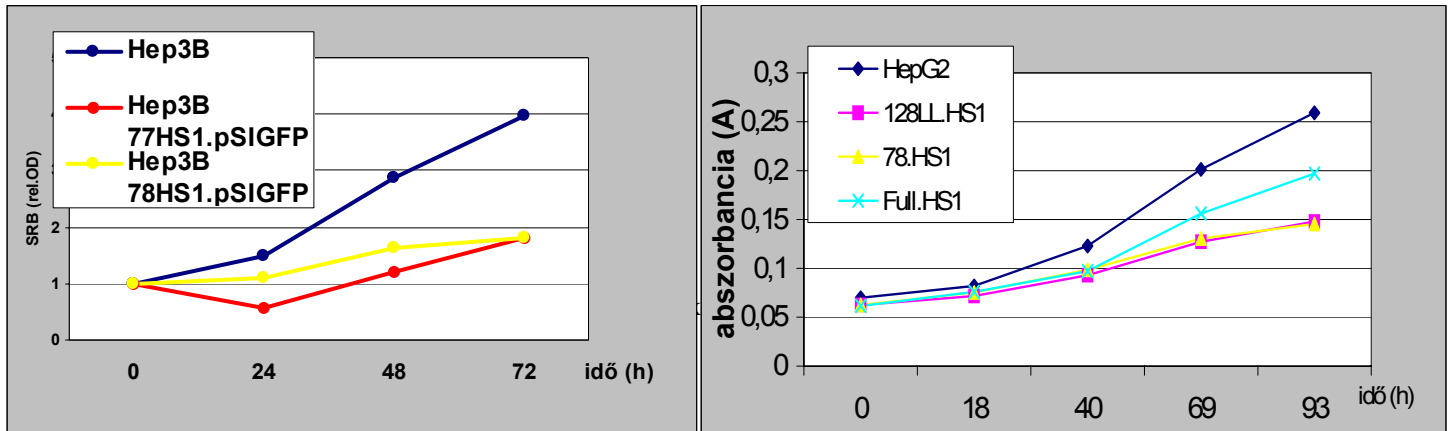
Szérumfüggés

A 77-es transzfektánsok szérumfüggése változatlan maradt.

A full és a 78-as exportszignállal rendelkező konstrukciót tartalmazó stabil transzfektánsok szaporodása a vad típusú sejtek igényének megfelelő, 10 % FBS jelenlétében gyakorlatilag leállt. A tápfolyadék szérumkoncentrációját 20 %-ra emelve ezek a sejtörzsek újra normális ütemben nőttek. Későbbiekben a full transzfektáns növekedése már csak 50 nM hydrokortizon, 1 mM nátrium-piruvát és 20 µg/ml inzulin hozzáadásával volt biztosítható.

Sejtciklus paraméterek és a növekedési ütem változása

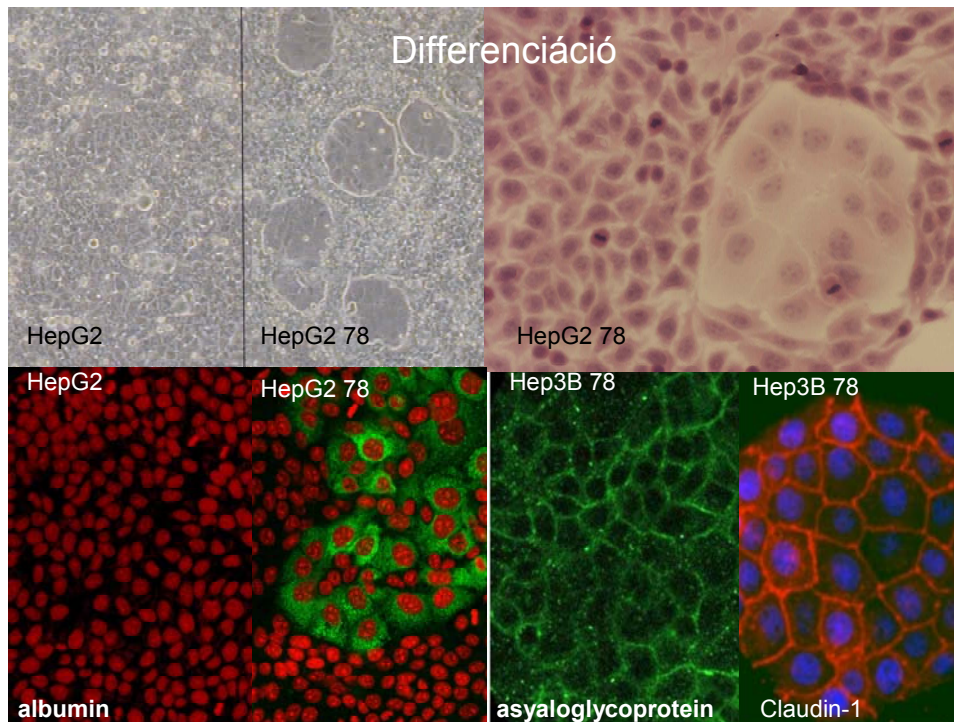
Mindkét hepatóma vonal esetében a 77 konstrukció növelte, a 78 konstrukció csökkentette az S fázis arányát. A differenciált szigetekben alig találtunk sejtoszlást. A HepG2 és Hep3B 78 transzfektánsokban a növekedés üteme a felére csökkent (2. ábra).



A növekedési görbékkel jól összhangban volt a sejtvonalak hematoxilin-eozinnal festett morfológiai képe, ahol a HepG2 78 vonalban differenciált szigetekben, míg a Hep3B 78 vonalakban diffúzan lecsökkent az osztódó sejtek aránya. Ugyanakkor, a 78 konstrukcióval transzfektált tenyészetekben differenciálódás jeleit észleltük

A full konstrukció bejuttatása a sejtek morfológiáját lényegesen nem változtatta meg. Hasonlóképpen változatlan maradt a 77 konstrukció a transzfekció után.. (3. ábra).

3.ábra: A HepG2 78-as transzfektáns morfológiai változása és differenciációs markerek a 78-as vonalakban. A jobb alsó képen látható, hogy a vad típusú sejt negatív az albuminra, de negatívnak bizonyult a többi markerre is.



A Hep3B esetén a jelenség diffúz volt, az eredeti tumorra jellemző orsószerű, szarkomatózus sejtalakok eltűntek. A differenciálódás megjelenése előtt 1-2 nappal az EGFP-vel fuzionált syndecan fehérje expressziója a környezethez képest megemelkedett.

Differenciációs markerek megjelenése

Albumin megjelenése

A két hepatóma vonal az alkalmazott tenyésztési körülmények között nem termel albumint. A 78 konstrukcióval létrehozott stabil transzfektánsokban az albumintermelés a morfológiai változásokon átesett sejtekben megindult. Érdekes jelenséget tapasztaltunk, a Hep3B esetén az albumintermelés már a 77HS1 stabil transzfektánsokban is megjelent, bár jóval kisebb mértékben.

Aszialoglikoprotein receptor-1 megjelenése

A receptor májspecifikus. A vad típusú hepatómákban nem tudtuk kimutatni a 78 transzfektánsok felszínén viszont megjelent a fehérje.

Két tight junction fehérje a claudin-1 és claudin-7 megjelenése.

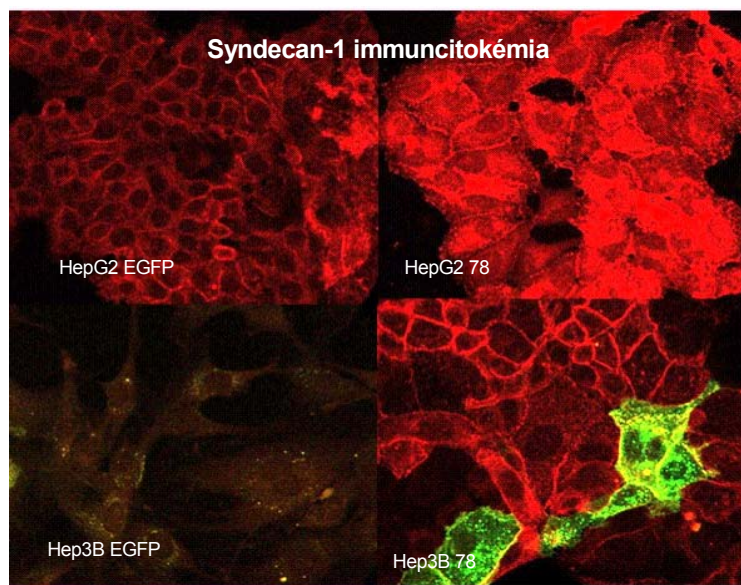
A claudin család 3 tagját az 1, 4, és 7 claudint vizsgáltuk. Ezek közül egyik sem található a vad sejtekben és az EGFP transzfektánsokban. A 78-as vonalakban az claudin 1 és 7 fehérje újra megjelent.

Endogén syndecan-1 expressziójának megemelkedése

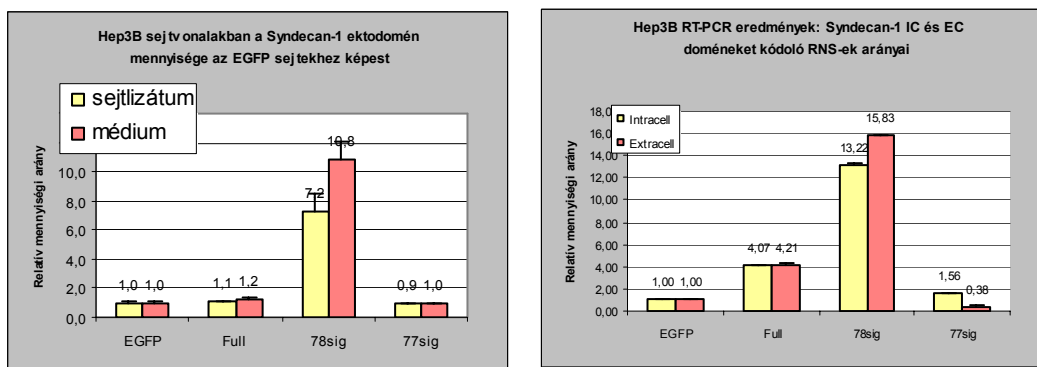
A HepG2 sejtvonal vad típusa termel syndecan-1-et, a Hep3B vad típusa nem. A csonkolt syndecan-1-et tartalmazó 78 konstrukció hatására a HepG2 sejtvonalban a syndecan-1 expresszió jelentősen fokozódott, a Hep3B sejtvonalban pedig megjelent. Ezt fluoreszcens immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük, ahol az alkalmazott elsődleges ellenanyag a syndecan-1 extracelluláris BB4 epitópja ellen termeltetett, amit a bejuttatott fúziós syndecan nem tartalmazott, így a kapott jel csakis az endogén syndecan-1 megnövekedett mennyiségét mutatja (4. ábra)

4.ábra. A HepG2 EGFP kifejezi, a Hep3B EGFP nem a syndecan-1-et. Előbbiben fokozódik, utóbbiban megjelenni a fehérje a 78-as konstrukcióval történt transzfelektációt követően.

A jelenség real-time PCR és syndecan-1 ELISA vizsgálatokkal is alátámasztható volt



(5.ábra).



5.ábra: Real-time PCR és syndecan-1 Elisa a syndecan-1 expressziójának vizsgálatára. Feltűnő, hogy a csonkolt 78-as konstrukcióban fokozódik az endogén syndecan mennyisége, mivel az ellenanyag az extracelluláris doménjét ismeri fel.

A sejtszabályozás változása

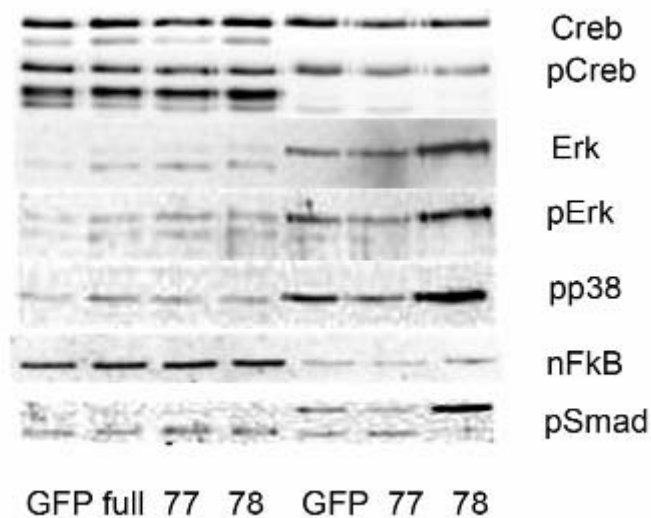
A syndecan-1-gyel kapcsolatos jelátviteli utak feltárása sok molekulacsoportnak volt eddig is célpontja. Ezek között eddig a MAPK útvonalak és a syndecan-1 shedding kapcsolata

emelhető ki. Mi ezek mellett vizsgáltuk a Creb, NFkB pSmad2 és az Ets-1 transzkripciós faktor expresszióját.

Eredményeink arra utalnak, hogy a két hepatóma sejtvonalon ezek a jelátviteli utak nem azonos módon változtak meg. A Hep G2 esetén a sejtmagi frakcióban 78-as transzfektánsban a foszforilált Creb mennyiségének emelkedése szembeötlő, és minden transzfektánsban fokozódik a foszforilált 44-42 ERK és p38 MAPK, a Hep3 B esetén a 78-as vonalban a foszforilált 44-42 ERK, a p38 MAPK és a pSmad2 expressziója fokozódik.

6.ábra : Jelátviteli fehérjék sejtmagi frakcióinak változása a syndecan-1 transzfektánsokban

A vad típusu hepatóma vonalakban és az EGFP transzfektánsokban az Ets-1 transzkripciós faktor intenzív sejtmagi reakciót ad. A 78HS konstrukcióval stabilan



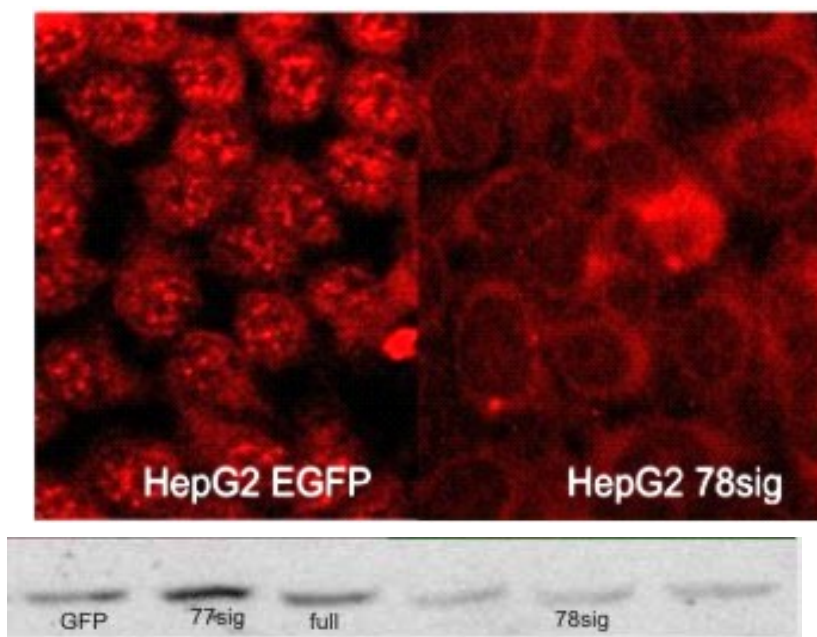
transzfektált hepatóma vonalakban az Ets-1 expresszió jelentősen csökken, vagy eltűnik. A Ets 1 eltűnését az általa szabályozott matrilysin proteáz mennyiségének és aktivitásának csökkenése kíséri (7.ábra).

A syndecan-1 vedlése (shedding)

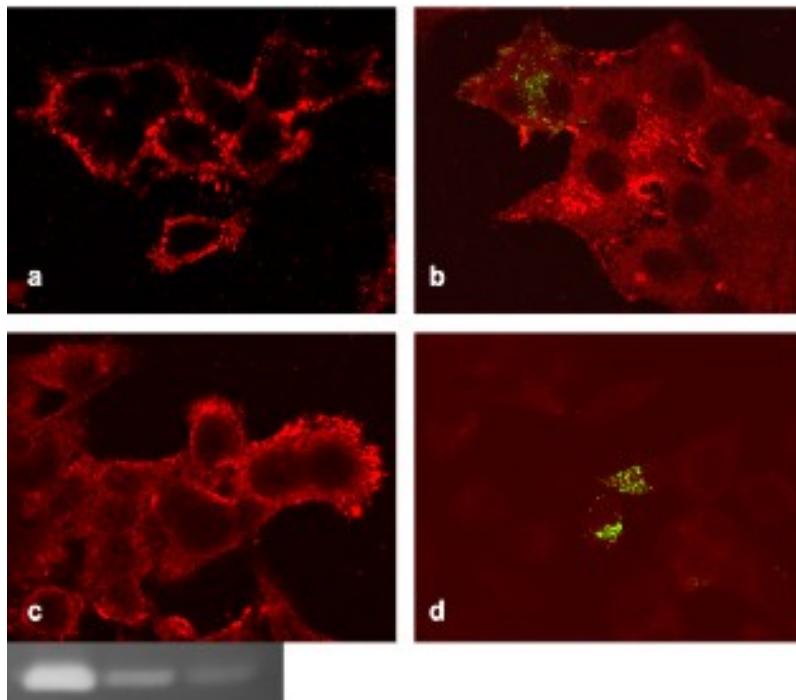
A shedding szerepét egyre inkább hangsúlyozzák különböző biológiai folyamatokban. Tumorok esetében fokozódása általában a daganat invazivitásával kapcsolható össze.

Hepatóma modellünkben mind a 78 sig mind a full transzfektáns esetén csökkent a syndecan-1 extracelluláris doménjének lehasadása. A jelenség magyarázatára tanulmányoztuk a sejtfelszínhez kötött MMP7 (matrilysin) expresszióját és aktivitását, mivel erről a proteázról köztudott, hogy szerepet játszik a syndecan-1 lehasításában.

Feltételezéseinknek megfelelően a matrilysin mennyisége és aktivitása csökkent, ez legkifejezettebben a 78sig transzfektáns esetén volt megfigyelhető (8.ábra).



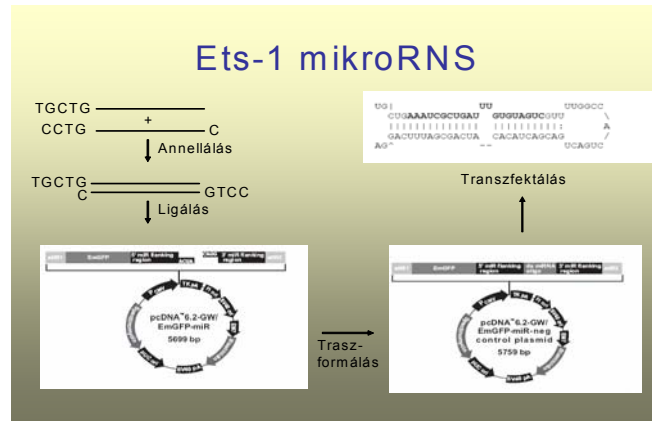
7.ábra: Az Ets-1 protoonkogén expressziójának csökkenése a sejtmagban immuncitokémiával. A Western blot megerősítette az eredményt.



8.ábra: Matrilysin immuncitokémia: a:EGFP, b:full, c:77, d:78-as transzfektáns. Utóbbiban szinte alig lehet reakciót látni. A mintákból készült zymogrammon látni, hogy az enzim aktivitása csökkent.

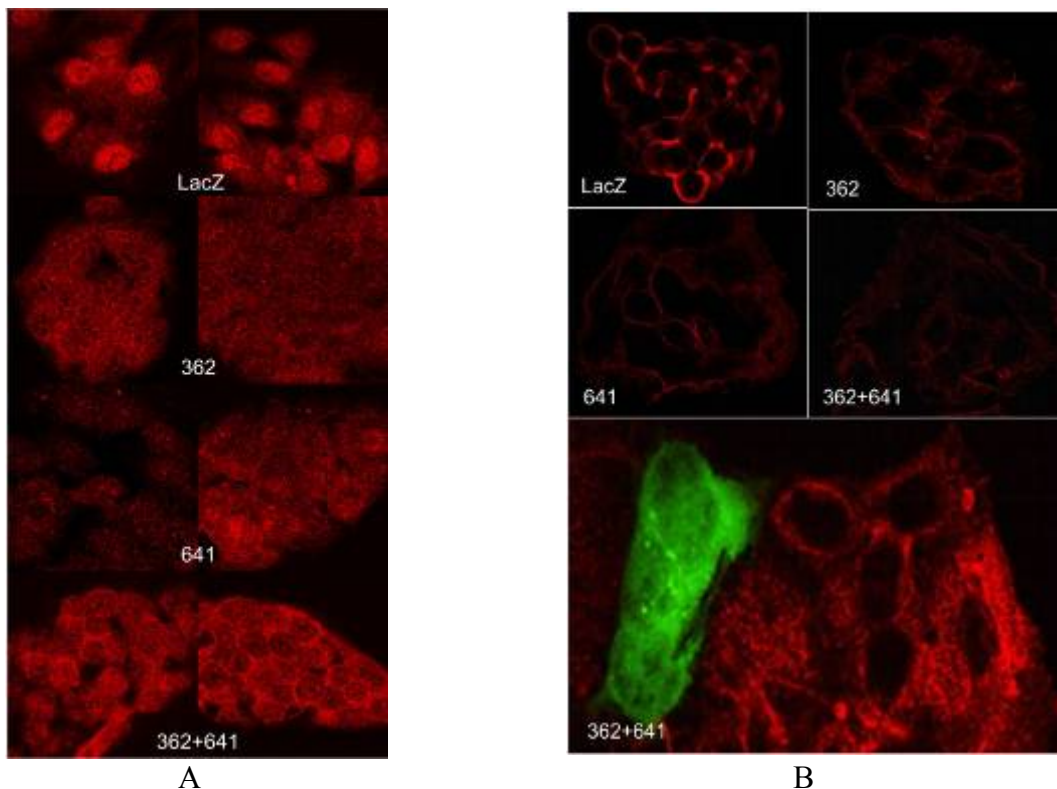
Az Ets-1 mRNS mikroRNS-el történő gátlásának hatásai a HepG2 hepatóma transzfektánsokra.

Mivel vizsgálataink egyértelműen arra utaltak, hogy az Ets-1 transzkripciós faktor mennyiségének csökkenése fontos szerepet játszik a 78-as transzfektánsokban leírt változásokban, Ets-1 mikroRNS konstrukciókat hoztunk létre és ezekkel transzfektáltuk a



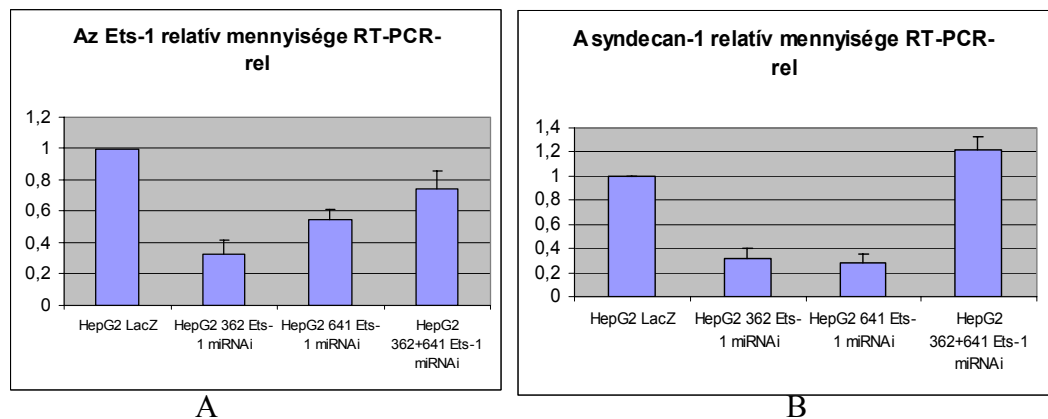
HepG2 sejteket. Az Ets-1 két régiójáról terveztünk oligonukleotidot, ezeket külön-külön és kombinálva is bejuttattuk a sejtekbe. A transzfekció eredményességét a GFP fluoreszcenciája mutatta. A transzfektánsokat ezt követően Blaszticidin antibiotikummal és a GFP fluoreszcencia intenzitása alapján is szelektáltuk.

Ezt követően vizsgáltuk az ETS-1 és a syndecan-1 mRNS és fehérje expresszióját (9-10.ábra)

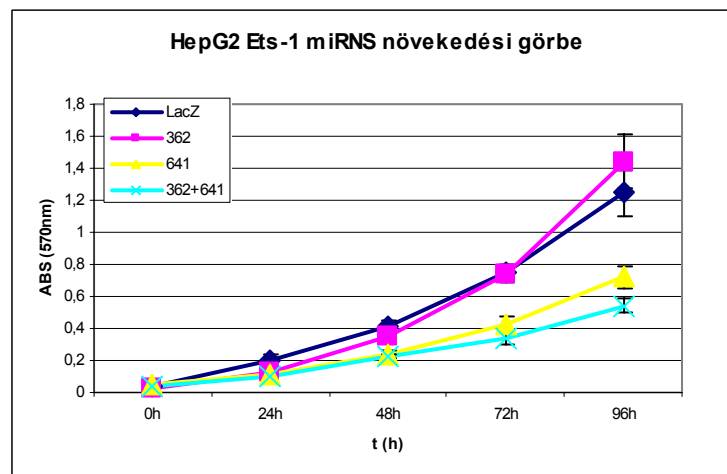


9. ábra: A: az Ets-1 mikroRNS hatása az Ets-fehérje expressziójára. Látható, hogy a sejtek magjában jelentősen csökken a pozitívitás. B: Ezzel egyidejűleg a syndecan-1 fehérje is csökken a mikroRNS-el

transzfektált sejtekben. A B panel alsó ábráján az látható, hogy az erősen EGFP pozitív sejtekben, ami a mikroRNS mennyiségével arányos, egyáltalán nincs syndecan-1 fehérje.



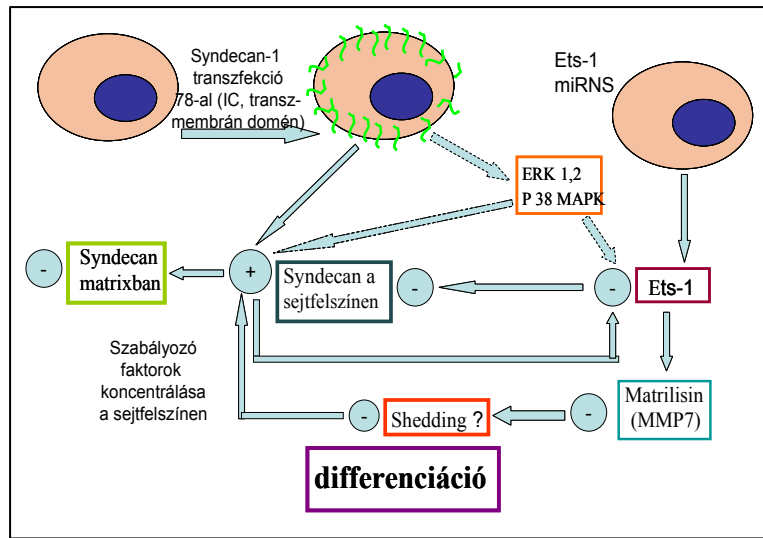
10. ábra: Real-time PCR-el határoztuk meg az Ets-1 és syndecan-1 mRNS mennyiségét. Látható, hogy az mindkét esetben csökken, de a kísérlet megismétlését tervezzük a kettős transzfektánsnál észlelt ellentmondás miatt.



11. ábra: Az Ets-1 mikroRNS-el stabilan transzfektált vonalak növekedési görbéje. Itt úgy tűnik a 362-es transzfektáns növekedési üteme nem csökkent. A kísérlet megismétlése folyamatban van.

Következtetések:

A hepatómákon végzett vizsgálataink szerint a syndecan-1 csonkolt variánsával, mely megfelel annak a syndecan darabnak, ami a shedding után a sejten marad, a tumorok differenciációja idézhető elő. A hatásban központi szerepe van az Ets-1 protoonkogén inaktivációjának, és az általa szabályozott matrilysin (MMP7) fehérje csökkenésének. A syndecan-1 és az Ets-1 kapcsolata egy negatív feed-back viszony, az Ets-1 pozitívan hat a syndecan expresszióra, annak magas szintje, viszont csökkenti az Ets-1 fehérje mennyiségét.



A rendszerben kétséget kizáróan érintett a MAPK a Creb, NFkB és SMAD rendszer, azonban ezek jelentősége a két hepatóma sejtvonalban eltérő. Szerepük tisztázása további feladat.

A syndecan és az Ets-1 fent leírt kapcsolata nem érvényes más rendszerekre, melyet a HT 1080 fibroszarkóma segítségével demonstráltunk.

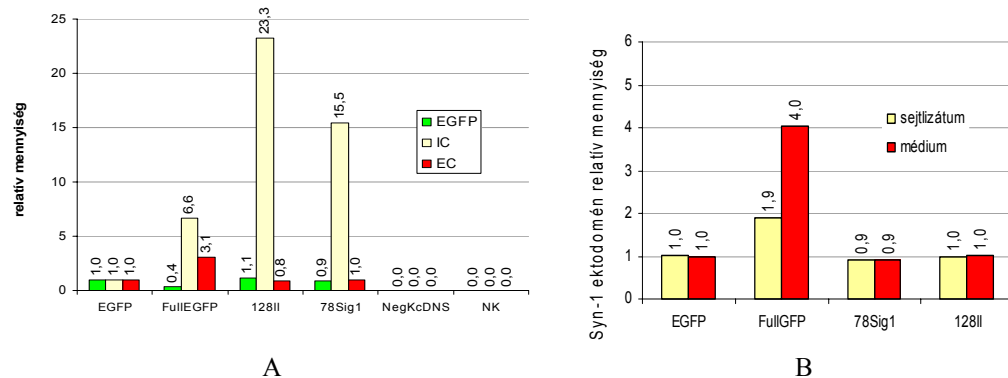
Ebben a sejtvonalban a syndecan és csonkolt transzfektánsai fokozták a sejtek malignitását, azáltal, hogy növekedési ütemüket és áttétképzésüket növelték. Ebben a rendszerben nem találtunk összefüggést az Ets-1 és a syndecan-1 expressziója között. Ebből arra következtetünk, hogy a syndecan hatását azok a jelátviteli folyamatok szabják meg, melyek egy adott sejtben rendelkezésre állnak. További kutatásaink ezeket az eseményeket célozzák meg.

A syndecan-1 transzfektáció hatása a mesenchymális eredetű HT 1080 fibroszarkóma biológiai viselkedésére.

A syndecan konstrukciók kifejeződése a HT 1080 sejtekben

A konstrukciók bejuttatása sejtekbe sikeres volt. A teljes méretű fehérjét termelő sejteknél a zöld fluoreszcencia a sejtfelszínen jelent meg. Gyengébb, de hasonló reakciót kaptunk a 78 sig konstrukció esetében, míg a kontrol, csak EGFP-t kódoló, vektor esetén a zöld fluoreszcencia egyenletesen oszlott el a sejtekben. A transzfektáció sikerességét mRNA és fehérje szinten is leellenőriztük. A 4a. ábrán a real-time PCR eredményei láthatók. A kontrol sejtekhez képest a full konstrukcióval transzfektált sejtekben mind az intra, mind az

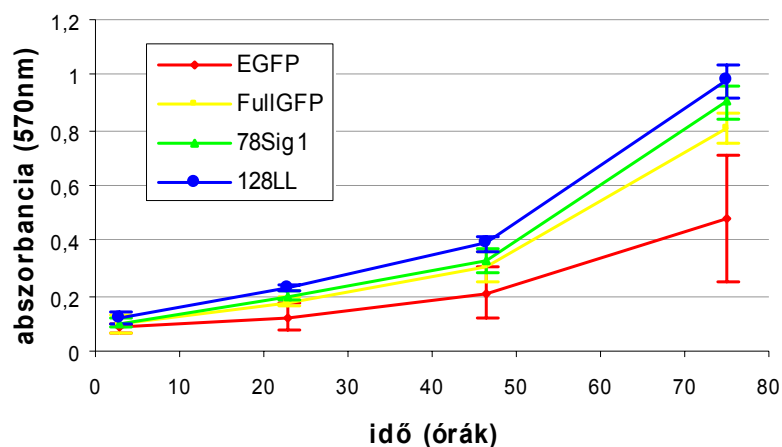
extracelluláris domént kódoló mRNS mennyisége fokozódik. A csonkolt fehérjét termelő transzfektánsokban csak az intracelluláris és transzmembrán domén mRNS-e szaporodik fel. ELISA-val meghatároztuk a syndecan-1 extracelluláris doménjének mennyiségét a sejtfelszínen és a médiumban. Utóbbi ad információt arról, milyen mennyiségben hasítódik le és jut a médiumba a fehérje extracelluláris doménje (shedding). Látható, hogy az extracelluláris domén mennyisége csak a full transzfektánsban növekszik és a többi sejtvonalhoz képest fokozódik a fehérje lehasadása is (12. ábra).



12. ábra: A: a syndecan-1 intracelluláris és extracelluláris szakaszát kódoló mRNS expressziójának változása real-time PCR-el meghatározva. B: a syndecan-1 fehérje ektodoménjének meghatározása a sejtfelszínen és a kondicionált médiumban syndecan ELISA segítségével. Csak a full transzfektánsban fokozódik a fehérje levedlése (shedding).

A stabil transzfektánsok növekedési paraméterei in vitro..

Az 13. ábrán látható, hogy a syndecan-1-et termelő vonalak növekedési üteme a kontrollhoz képest felgyorsult. A sejtek növekedése nem mutatott szérumszükségletet.



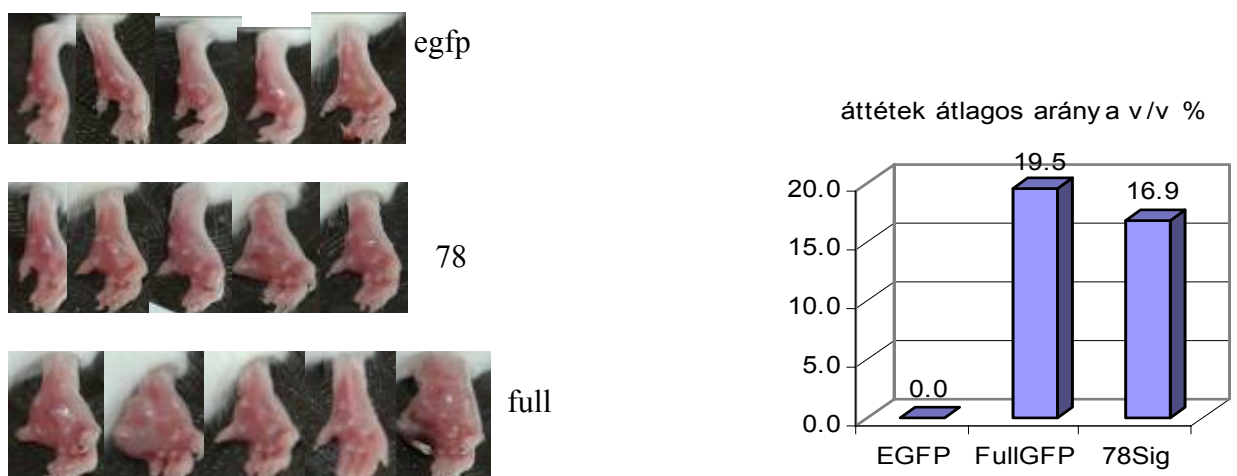
13. ábra. A HT 1080 transzfektánsok növekedési görbéje. Gyakorlatilag minden transzfektáns gyorsabban nő, mint a kontrol EGFP-t hordozó vonal.

A syndecan transzfektáns HT1080 vonalak viselkedése állatoltást követően.

Transzfektáns sejt vonalainkat Scid egerek talpába oltottuk egerenként 10^5 tumorsejtet alkalmazva. Vizsgáltuk a talptumorok kialakulásához, valamint az áttétek megjelenéséhez szükséges időt. A talptumorok kialakulásához a kontrol (EGFP) sejt vonal esetén 64 nap, a full és 78 transzfektánsok esetén 36 napra volt szükség. A 14. ábra jól szemlélteti az azonos időben történt oltást követően a tumorok eltérő növekedési ütemét. Látható, hogy a kontrol sejt vonallal oltott állatokban még alig alakult ki a tumor, amikor a full konstrukciót hordozó sejtek már jelentős nagyságú daganatokat képeztek. A csonkolt syndecan konstrukciót tartalmazó daganat növekedési üteme a kontrol és a teljes fehérjét kifejező tumorok közé esett.

A talptumorok kialakulását követően a tumoros végtagokat amputáltuk és majd vizsgáltuk a tüdőáttétek mennyiségét. A tüdőben talált átlagos áttétszámot a 6 II. ábra mutatja be. A csak EGFP konstrukcióval transzfektált tumor talpbaoltását követően nem alakultak ki tüdőáttétek. A teljes syndecan-1 fehérjét és a csonkolt fehérjét termelő daganatok esetén az 5-5 állatból 3-3-ban találtunk áttéteket. Amennyiben a tumorokat vénásan oltottuk be, akkor is a tüdőbe kolonizáltak. Ebben az esetben az EGFP transzfektánsok is hoztak létre daganatokat, ezek száma és mérete azonban kisebb volt, mint a syndecan-1 transzfektánsoké. A syndecan-1 extracelluláris doménjét felismerő ellenanyaggal vizsgálva az EGFP konstrukciót hordozó tumorok felszínén alig lehetett kimutatni a fehérjét, míg a full és 78 sig.

HT 1080 transzfektánsok lokális növekedése egértalpban



14. ábra: A syndecan-1 transzfekció hatása a HT 1080 fibrosarcoma sejtek biológiai viselkedésére. A: a talpa oltott tumorok növekedése felgyorsul, B: áttétképzésük fokozódik.

transzfektánsokból kialakult daganatokban jelentős syndecan-1 expressziót figyeltünk meg a tüdőáttétekben.

Mivel a zöld fluoreszcenciát az állatba oltott daganatok megőrizték megfigyelhető volt az, hogy hova lokalizálódik a syndecan-EGFP kiméra fehérje. Meglepő módon a tenyészetben sejtfelszíni lokalizációt mutató zöld jelzés a tüdőáttétben, a magban is megfigyelhető volt.

A kutatás készütségi foka:

Két olyan modellrendszert dolgoztunk ki, melyek alkalmasak a syndecan-1 hatásának a vizsálatára. A heptómákat érintő vizsgálatok készütségi foka 90%-os. A munkból magyar nyelvű közlemény már született, az impaktfaktoros közlemény elkészítését nagymértékben hátramozdította, hogy 2006-ban ellopták azt a számítógépet, mely az összes adatot, és a félig megírt angol nyelvű dolgozatot tartalmazta. Sajnos ezért több kísérletet ismételni kellett.

A fibrosarcomával végzett vizsgálatok készütségi foka is 90%-osnak tekinthető. Szeretnénk itt is jelátviteli változásokat feltárni, ennek érdekében már elkészült egy jelátviteli makroarray, melynek validálása jelenleg folyik real-time PCR-el..

Irodalom

1. Iozzo R,V., Coheen I. Altered proteoglycan expression and the tumor stroma. *Experientia*.49: 447-455, 1993
2. Boudreau N., Bissel M. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Current Opinion in Cell biology*. 10: 640-646, 1998
3. Tlsty T.D., Hein P.W. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Current opinion in genetics and Development* 11: 54-59, 2001
4. Proia D.A., Kuperwasser C. Stroma:tumor agonist or antagonist. *Cell Cycle* 4: 1022-1025, 2005
5. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 8:365-93, 1992
6. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*. 327:1-16, 1997

7. Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 1: 89-98, 2001
8. Inki P, Jalkanen M. The role of syndecan-1 in malignancies. *Ann Med.* 28: 63-7, 1996.
9. Inki P, Stenback F, Talve L, Jalkanen M. Immunohistochemical localization of syndecan in mouse skin tumors induced by UV irradiation. Loss of expression associated with malignant transformation. *Am J Pathol.* 139:1333-40, 1991
10. Fujiya M, Watari J, Ashida T, Honda M, Tanabe H, Fujiki T, Saitoh Y, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res.* 92:1074-81, 2001
11. Conejo J.R., Kleef J., Koliopanos A., Matsuda K., Zhu ZW., Goecke H., Bicheng N., Zimmerman A., Korc M., Friess H., Buchler M.W. Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer.* 88:12-20, 2000
12. Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C. Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer.* 95: 1-6, 2001
13. Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberland S, Bernfield M. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet.* 25:329-32, 2000
14. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer.* 74: 482-91. 1997
15. Kovalszky I, Pogany G, Molnar G, Jeney A, Lapis K, Karacsonyi S, Szecseny A, Iozzo RV. Altered glycosaminoglycan composition in reactive and neoplastic human liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 167:883-90, 1990
16. Máthé M., Suba Zs., Németh Zs., Tátrai P., Füle T., Borgulya G., Barabás J., Kovalszky I. Stromal syndecan-1 expression is an adverse prognostic factor in oral carcinomas. *Oral Oncology* 42: 493-500. 2006
17. Dudas J, Ramadori G, Knittel T, Neubauer K, Raddatz D, Egedy K, Kovalszky I. Effect of heparin and liver heparan sulphate on interaction of HepG2-derived transcription factors and their cis-acting elements: altered potential of hepatocellular carcinoma heparan sulphate. *Biochem J.* 350: 245-51, 2000
18. Brockstedt U, Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A. Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. *Exp Cell Res.* 274: 235-45. 2002

19. Sanderson RD, Borset M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol.* 81:125-35, 2002
20. Sanderson R.D., Yang Y., Kelly T., MacLeod V., Day Y., Theus A. Enzymatic remodelling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: Growth regulation and prospect of new cancer therapies. *J Cell Biochem* 96: 897-905, 2005
21. Kovalszky I., Dudás J., Gallai M., Hollósi P., Tátrai P., Tátrai E., Schaff Zs. Proteoglikánok a májban. *Magyar Onkológia*, 48: 207-213, 2004
22. Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol.* 149: 995-8, 2000
23. Gallagher JT. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest.* 108:357-61, 2001
24. Yi JY., Han I., Oh ES. Transmembrane domain-dependent oligomerization of syndecans. *Scientific WorldJournal* 6: 457-459,2006.

IV. Az agrin immunhisztokémiai kimutatásának alkalmazhatósága a hepatocelluláris karcinóma differenciáldiagnosztikájában.

Korábbi munkánk során igazoltuk, hogy az agrin nevű extracelluláris mátrix-alkotó heparánszulfát-proteoglikán megtalálható a máj epeújtjainak és ereinek bazális membránjában (1,2). Mivel a máj szinuszoidjai nem tekinthetők zárt kapillárisnak, és bazális membránjuk igen laza, sem az ép máj szinuszoidjainak, sem a cirrhotikus regeneratív parenchyma-nodulusok szinuszoidjainak bazális membránjaiban nem található meg az agrin. A cirrhotikus májban ezért az agrin csak a proliferáló epeduktulusok bazális membránjában, valamint a kötőszövetes sövények ereinek falában található meg (1. ábra). Ezzel szemben a hepatocelluláris karcinóma újdonszerű erei valódi, zárt, teljes értékű bazális membránnal rendelkező kapillárisok, amelyeknek alaphártyája ezért agrint tartalmaz.

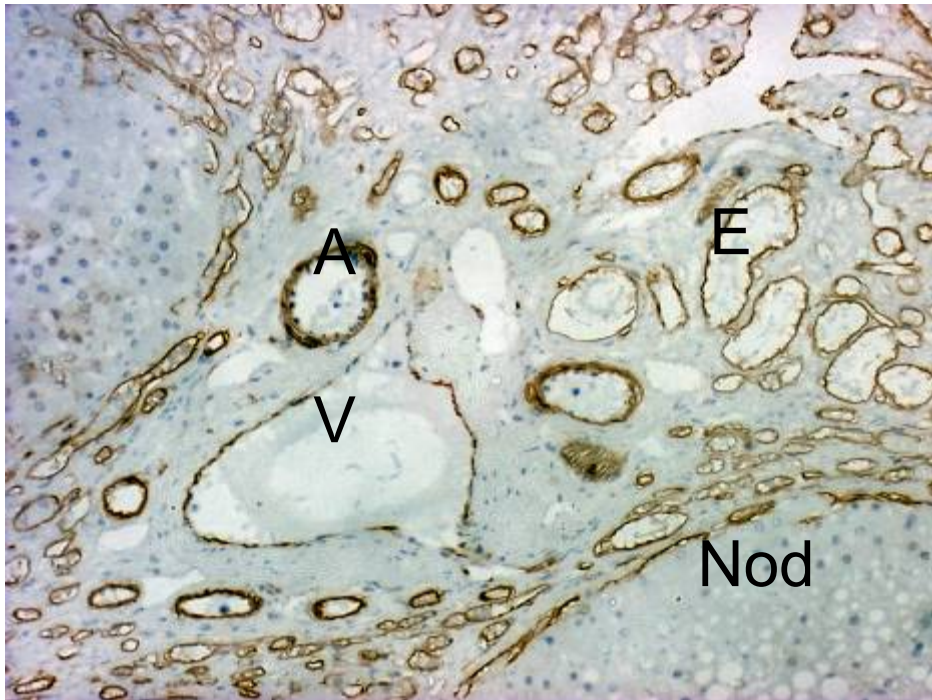
A cirrhotikus máj regeneratív nodulusainak szinuszoidjai és a hepatocelluláris karcinóma neovaszkulaturája közötti különbséget tehát agrin elleni immunhisztokémiával láthatóvá tehetjük (2. ábra). Ez lehetőséget ad a hepatocelluláris karcinóma felismerésére a cirrhosis háttere előtt. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy milyen hatékonyan alkalmazható ez a módszer a máj primer malignus lézióinak detektálásában. Az agrin differenciáldiagnosztikai értékét két hagyományos ér-markerével – CD31 és CD34 – vetettük össze, amelyek elvileg szintén alkalmasak a szinuszoidok és a tumor-erek közötti különbségek kimutatására (3,4), mivel a tumor kapillárisaiban nem csak a bazális membrán szerkezete, hanem az endothelsejtek immunfenotípusa is megváltozik.

18 formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintán összesen 58 immunhisztokémiai reakciót végeztünk el a három kiválasztott immunsavóval. A reakciókat egy általunk felállított négyfokozatú skála alapján (0 / + / ++ /+++) két független megfigyelő értékelt; a két értékelés egymással lényegében maradéktalanul egybevágtott.

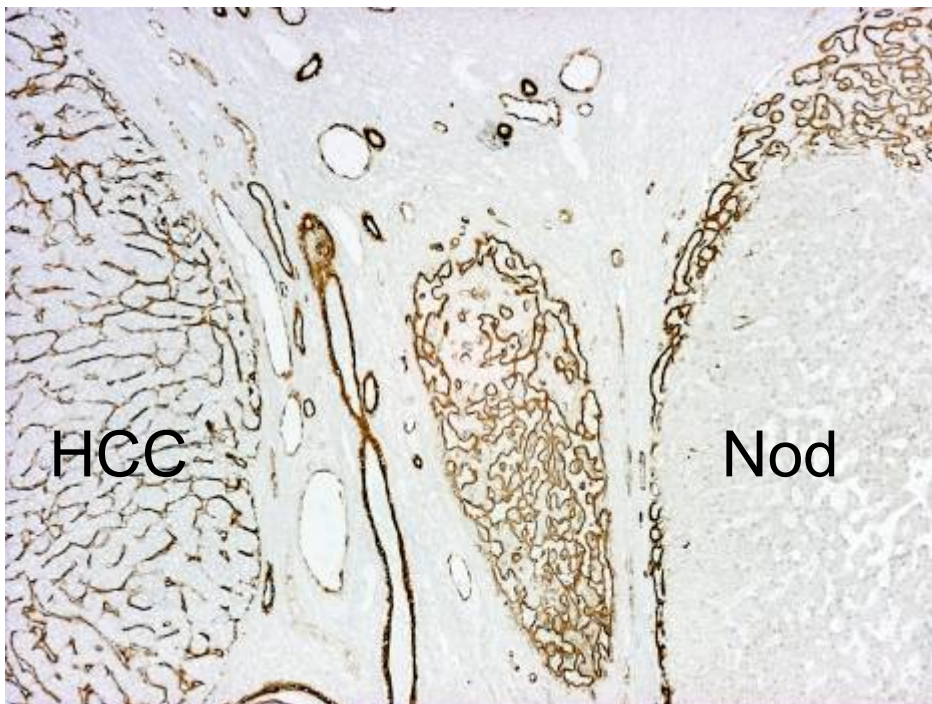
A 3a. és 3b. ábrák reprezentatív immunreakciókat mutatnak be, az összesített eredményeket pedig a 4. ábra ismerteti. A diagramokról leolvasható, hogy mindhárom marker rendkívül erősen jelöli a HCC ereit. A két konvencionális ér-marker ugyanakkor a cirrhotikus göbök szinuszoidjaiban is igen gyakran jelenik meg nagy intenzitással, míg az agrin ezeket a struktúrákat csak ritkán jelöli.

A reakciókat két csoportba sorolva (0 és +: negatív, + és ++: pozitív) kiszámítható az egyes immunreakciók szenzitivitása és specifitása a HCC felismerésében. Szenzitivitás tekintetében mindhárom marker 100%-os értéket ad, hiszen valamennyi intenzíven jelöli a HCC ereit. Ugyanakkor specifitásukra nézve a markerek különböznek: a CD31 60%-os (n=19; Fisher-féle egzakt teszt, p=0.01), a CD34 mindössze 38%-os (n=20, p=0.11), míg az agrin 92%-os (n=19, p=0.0002) specifitással rendelkezik. Ugyan a mintaszámok még alacsonyok, ez az eredmény azt vetíti előre, hogy az agrin elleni immunhisztokémia alkalmazható a leghatékonyabban a HCC és a cirrhosis elkülönítésére.

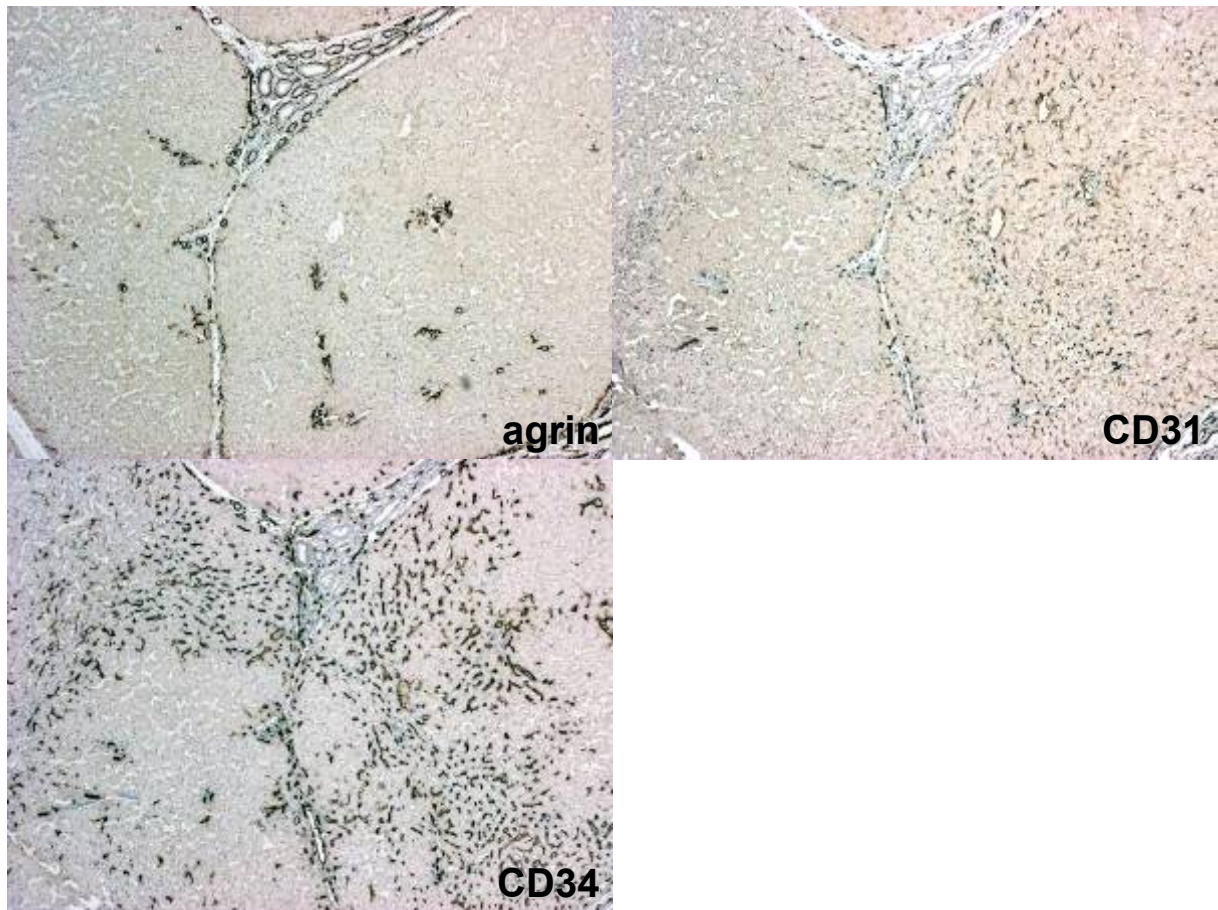
Problémát okozhat ugyanakkor egyes, magas regenerációs aktivitással bíró cirrhotikus esetén az, hogy a hepatocytává differenciálódó epeúti sejtek (5) agrin-tartalmú bazális membránja csak fokozatosan vész el, ezért a nodulusok széli területein agrin jelenik meg. Korábban igazoltuk, hogy az epeutakban megjelenő, illetve a tumor ereiben megjelenő agrin nem azonos forrásból származik: az epeúti agrint maguk az epeúti hámsejtek, míg a tumor-erekben található agrint feltehetően az ereket körülvevő pericyták termelik (5. ábra). Differenciáldiagnosztikai értéke csak a tumorerekben megjelenő – és a szinuszoidokból hiányzó – agrinnak van. Az epeúti eredetű, félrevezető agrin-pozitivitás hatását azzal szűrhetjük ki, ha a nodulusok széli területeit figyelmen kívül hagyjuk a reakció értékelésekor.



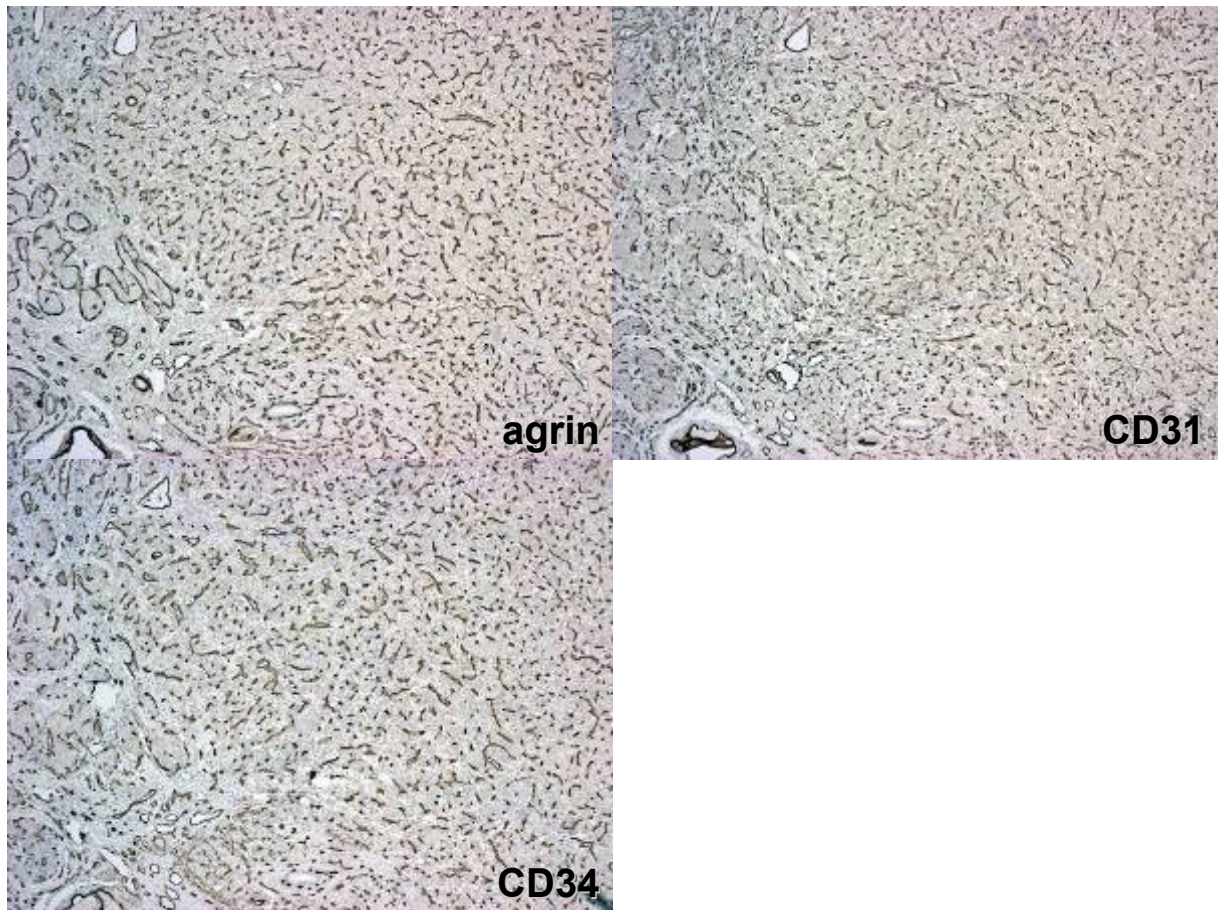
1. ábra: *Agrin* immunhisztokémiával jelölődő struktúrák a cirrhotikus májban. Az agrint megtaláljuk az erek falában (A, artéria; V, véna), valamint a kisebb-nagyobb epeutak bazális membránjában (az E egy nagyobb átmérőjű epeutat jelöl), de nem jelöli a nodulusok (Nod) szinuszoidális falait.



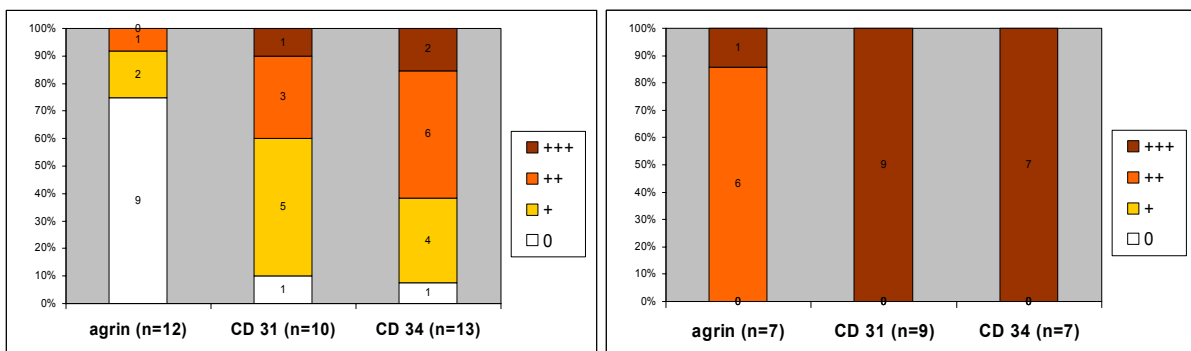
2. ábra: HCC és cirrhotikus nodulus elkülönítése *agrin* immunhisztokémia segítségével. A HCC neovaszkulaturája intenzíven ábrázolódik, miközben a proliferáló epeuktusuktól körülvevő regeneratív nodulus szinuszoidjai teljesen negatívak.



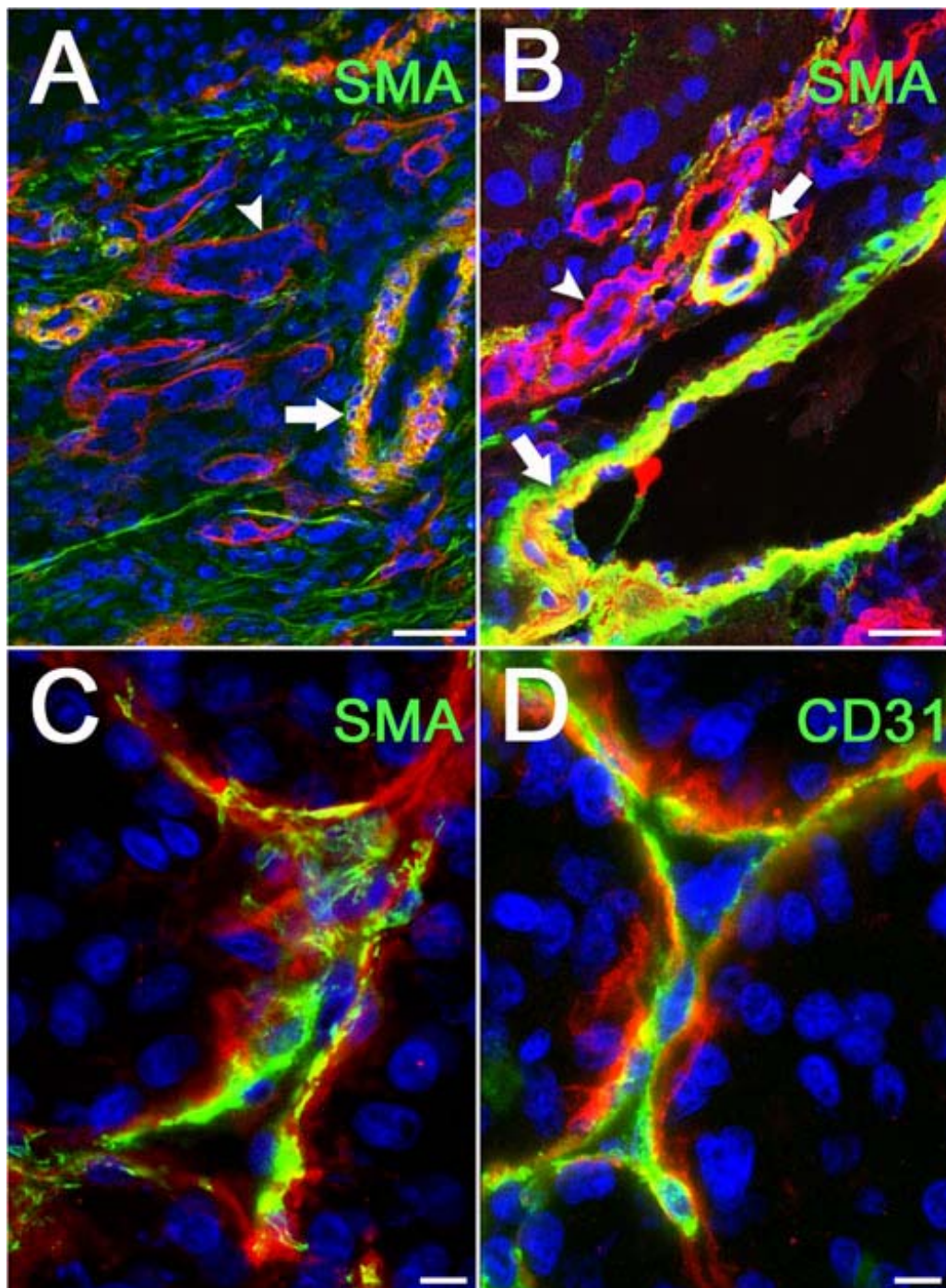
3a. ábra: *Agrin*, *CD31* és *CD34* immunhisztokémia cirrhotikus májon. Míg az agrin csak a kötőszövetes sővények ereit és epeútjait jelöli (a nodulusokon belül csak a tangenciálisan benyúló septumok struktúrái adnak pozitívítást), a *CD31* és *CD34* a szinuszoidális endotheliumban is megjelenik kisebb-nagyobb mértékben. A *CD34* esetében a szinuszoidális pozitívítás kifejezett.



3b. ábra: *Agrin*, *CD31* és *CD34* immunhisztokémia HCC-n. A HCC neovaszkulaturája mindhárom markerrel élénken ábrázolódik.



4. ábra: Az immunhisztokémiai eredmények összefoglalása. Míg a HCC (jobb oldali grafikon) mindhárom markerrel erősen jelölődik, a cirrhosis (bal oldali grafikon) immunfestése agrinnal jellemzően gyenge, a CD31-gyel és CD34-gyel viszont változó erősségű.



5. ábra: Az epeúti és az erekben megjelenő agrin eltérő eredete. Az epeutak területén (A, B: nyílhegyek) a piros színreakcióval látható agrin nem kolokalizál a zölddel jelölt simaizomaktinnal, tehát azt nem kötőszöveti sejtek, hanem maguk az epeúti hámsejtek termelik. Ezzel szemben a nagyobb erek falában (A, B: nyilak), valamint a HCC mikroereiben (C) az agrin és az SMA-pozitív sejtek kolokalizálnak. Ezek a SMA-pozitív sejtek vaszkuláris simaizomsejtek a nagyobb erek, és miofibroblaszt-fenotípusú pericyták a tumor mikroereinek esetében. A CD31-pozitív endothelsejtek (zöld, D) szerepe az agrin termelésében pillanatnyilag még nem tisztázott.

Vonatkozó irodalom

1. Kovalszky I, Dudas J, Gallai M, Hollosi P, Tatrai P, Tatrai E, Schaff Z. Proteoglikánok a májban. *Magy Onkol.* 2004;48(3):207-13. Epub 2004 Nov 1. Review.
2. Tatrai P, Dudas J, Batmunkh E, Mathe M, Zalatnai A, Schaff Z, Ramadori G, Kovalszky I. Agrin, a novel basement membrane component in human and rat liver, accumulates in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2006 Sep 18; [Epub ahead of print]
3. Nagy P, László V, Schaff Zs. A hepatokarcinogenezis folyamata a humán májban. *Magy Onkol.* 2006;50(2):107-13. Epub 2006 Aug 4.
4. Frachon S, Gouysse G, Dumortier J, Couvelard A, Nejjarı M, Mion F, Berger F, Paliard P, Boillot O, Scoazec JY. Endothelial cell marker expression in dysplastic lesions of the liver: an immunohistochemical study. *J Hepatol.* 2001 Jun;34(6):850-7.
5. Paku S, Nagy P, Kopper L, Thorgeirsson SS. 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology.* 2004 May;39(5):1353-61.