

## OTKA T46633. Kemokinek, kemokin receptorok expressziójának regulációja tumor sejteken

### A munkamenet leírása

A tumor sejtek és mikrokoznyezetük között szoros kölcsönhatás áll fenn, amely alapvetően befolyásolja a malignus folyamat előrehaladását. A tumor sejtek, tumor-infiltráló sejtek, stróma sejtek egyaránt termelnek citokineket (növekedési faktorokat, gyulladásoos citokineket, gyulladásgátló citokineket, angiogenetikus, citotoxikus faktorokat, kemokineket), melyek komplex kölcsönhatását nehéz modellezni. A tumor sejtek által termelt kemokinek befolyásolhatják az infiltráló sejtpopuláció összetételét, beszűródését, funkcionális aktivitását, elősegíthetik a neovaszkularizációt, és számos egyéb funkcióval rendelkezhetnek. A tumor sejteken található kemokin receptoroknak többek között szerepe lehet a szerv specifikus metasztázisok kialakulásában. Ezt a korábbi hipotézist az utóbbi évek alatt mellrákban, melanómában, prosztatarákban, gyomorrákban nyert adatok meggyőzően támasztják alá. Kevés szó esik arról, hogy a kemokin receptorokon keresztül nemcsak a tumor sejtek migrációját, hanem egyéb élettani funkcióik megváltozását is befolyásolni lehet. Ez utóbbiak közül kiemelendő 1/egyos szolubilis faktorok, pl. neovaszkularizációt előidéző faktorok, citotoxikus és növekedési faktorok, gyulladásoos citokinek, kemokinek vagy olyan immunszuppresszív faktorok termelődésének esetleges megváltozása, 2/sejtfelszíni molekulák, pl. növekedési faktorok és „halál” molekulák receptorai, MHC molekulák, adhéziós molekulák, sejt-kölcsönhatásokban fontos molekulák, differenciálódási antigének, tumor antigének kifejeződésének esetleges megváltozása. Mindezen molekulák elviekben az egyes tumor sejtek sorsának fontos meghatározói. Hipotézisünk szerint a tumor sejteken a kemokin receptorok kifejeződését és a kemokinek termelését citokinek (mint a mikrokoznyezet elemei) ugyancsak képesek befolyásolni. Erre utaltak korábbi kísérleteink is, melyekben azt tapasztaltuk, hogy HeLa sejtek TNF kezelés hatására nagy mennyiségű RANTES-t és IL-8-at termeltek.

Munkánk alapvetően a fenti kérdések köré csoportosult. Mivel az előző években colorectális adenocarcinómákból izolált tumor sejtek és tumor infiltráló fehérvérsejtek citokin génexpresszió kvantitatív jellemzésével foglalkoztunk, e tumor típus vizsgálatánál maradtunk. Külön hangsúlyt fektettünk a metasztázisból és primer carcinómából nyert sejt vonalak közötti különbségek keresésére, ezért három olyan Dukes C stádiumú betegből előállított colorectális adenocarcinoma vonalat használtunk, melyek közül az egyik a primer daganatból (Isreco-1), a másik máj áttétből (Isreco-2), a harmadik peritoneális áttétből (Isreco-3) származott (Dr. B. Sordat, Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Epalingues, Svájc). Felhasználtunk a vizsgálatban egy normál colon epitheliális sejt vonalat is (Dr. M. J. Rutten, Portland, USA). Másik modell tumor sejtünk a humán cervicális carcinoma eredetű HeLa sejt volt.

Először a kiválasztott tumor sejtek konstitutív citokin, ill. kemokin termelését jellemeztük néhány általunk és a lehetőségeink által behatárolt citokin (IL-8, RANTES, IL-6, IL-10, TNF, TGF-

$\beta 1$ ) termelésének mérésén keresztül (fehérje és génexpresszió kimutatása; ELISA, RT-PCR). Ezzel kapcsolatosan kis kitérővel egy korábbi munkánkat is befejeztük, melyben colorectális adenocarcinómában szenvedő betegek primer tumor mintáiban megvizsgáltuk néhány citokin génexpresszióját (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-1 $\beta$ ) RT-PCR-rel. Ennek eredménye is azt mutatta, hogy érdemes a vizsgálatra tervezett citokinek kifejeződését tumor sejtekben célozatosan is megvizsgálni fehérje szinten.

Miután a primer és metasztatikus colorectális daganatsejtekben az IL-8, RANTES, IL-6, IL-10, TNF, TGF- $\beta 1$  termelődését jellemeztük, megkíséreltük azt in vitro befolyásolni stróma-sejt eredetű faktor-1 $\alpha$ -val (SDF-1 $\alpha$ ), mely feltételezhetően a vastagbél daganatok mikro környezetében is megtalálható kemokin. Az SDF-1 $\alpha$  szerepét leírták szerv-specifikus metasztázisok kialakulásában több tumor típusnál is (pl. mellrák, tüdőrák, prosztaták). A fehérjetermelés és génexpresszió mérésére ELISA, ill. RT-PCR, szemi-quantitatív RT-PCR módszert használtunk. Kísérleteinkben az IL-8 és az IL-6 termelés reaktivitást mutatott (emelkedett) SDF-1 $\alpha$  kezelésre HeLa sejtekben, a primer daganatból származó Isreco-1, valamint kisebb mértékben a normál colon epitheliális sejtekben. A HeLa sejtek SDF-1 $\alpha$  által irányított kemotaxisát is ki tudtuk mutatni. (A vastagbél daganat sejtek vizsgálatára nem került sor.) Kimutattuk a SDF-1 $\alpha$  receptorát, a CXCR4-et (fehérjét és génterméket) is a vizsgált sejteken (FACS, konfokális mikroszkóp, ill. RT-PCR). Mivel az IL-8 és az IL-6 termelés SDF-1 $\alpha$  hatására történő emelkedése az általunk vizsgált tumor sejtekben fontos új információ (pl. az IL-8 nemcsak fontos neovaszkularizációban szerepet játszó, hanem többek között növekedési faktor is vastagbél daganatsejtekben), megvizsgáltuk az IL-8 és IL-6 termelésének fokozódásához vezető jelátviteli utakat. Első lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy G-protein függő-e a hatás. A kísérleteket leszűkítettük a HeLa és az Isreco-1 sejtek vizsgálatára (IL-6, IL-8 mérés: ELISA). Meglepetésünkre több kísérletben is negatív eredményt kaptunk pertussis toxin (PTX) gátlószer alkalmazásával (más gátlószer alkalmazására nem volt lehetőség), pedig az irodalmi adatok többségében a PTX CXCR4 vonatkozásában hatásosnak bizonyult (legalábbis a kemotaxis gátlásában). Tovább vizsgálva, hogy mely egyéb reakció út jöhet szóba az SDF-1 $\alpha$  jelátvitelében, a JAK/STAT útvonalra terelődött a gyanú, ami be is igazolódott háromféle inhibitor (DBI/JAK inhibitor I, target: JAK1 [JAK2, JAK3]), AG490: target JAK2, WHI-P131/JAK3 inhibitor I: target JAK3) alkalmazásával (ELISA). Az SDF-1 $\alpha$  citokin termelésre kifejtett hatásának gátlása alapján úgy tűnt, hogy elsősorban JAK3 vesz részt az SDF-1 $\alpha$  IL-8 és IL-6 termelést serkentő hatásában, de az IL-8 termelés fokozása esetében a JAK2-nek is szerepe van. A konstitutív IL-8 és IL-6 termelésben a JAK3 szerepe biztos. A JAK1 szerepe nem zárható ki egyik esetben sem. A másodlagos reakció utak, ill. hírvivő molekulák közül a MAPK (p38, MEK/ERK, JNK/SAPK), az NF $\kappa$ B és a src kináz részvételét jellemeztük gátlószer segítségével. Gátlószer: MAPK: SB203580-p38, PD98059-MEK/ERK, SB202474-negatív kontroll vegyület az előbbiekhöz, SP600125/JNK inhibitor II- JNK/SAPK, SAPK inhibitor II-negatív kontroll vegyület az előbbihez; NF $\kappa$ B: CAPE; src kináz: PP1 analóg. Ezeket a kísérleteket csak HeLa sejteken végeztük. Adataink alapján az SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL-8 termelésben a MAPK útvonal, elsősorban a JNK

érintettsége merül fel. Az src kináz mérsékelt részvétele is valószínűsíthető. A konstitutív IL-8 termelésben a JNK és az src szerepe nem merül fel. Az SDF-1 $\alpha$ -val indukált és a konstitutív IL-6 termelésben egyik vizsgált útvonal, ill. hírvivő (MAPK, az NF $\kappa$ B és a src kináz) szerepét sem tudtuk igazolni.

A tumor sejteken teszteltük néhány kiválasztott, lehetőségeink által behatárolt kemokin receptor sejt felszíni és/vagy génkifejeződését. Antitestpanelünk CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR3, CXCR4 elleni antitestekből állt, melyek ligandumjai RANTES, IL-8, MIG, IP10, ITAC, MCP1,-2,-3,-4,-5, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , HCC1, HCC2, HCC4, MEC, MPIF1/CCL23, eotaxin, eotaxin-2, -3, GCP2, SDF-1 $\alpha$  voltak. RT-PCR-rel a CXCR4 és néhány más, metasztázisok kialakulásában más tumorokban szerepet játszó kemokin receptor, a CCR7, CCR10, továbbá kontrollként a CCR3 és CCR5 génexpresszióját is vizsgáltuk. A fehérje és géntermék teljes körű vizsgálatát HeLa sejten végeztük. A colorectális sejteken ellenanyag segítségével csak a CXCR4-et vizsgáltuk. Az mRNS vizsgálatok eredményesnek bizonyultak, megerősítették a fehérje szintű vizsgálatot, és új információhoz is vezettek. A HeLa sejtek CCR7-et és CCR10-et, a colorectális daganatsejtek CCR7-et expresszáltak. Ez utóbbi a normál colon epitheliális sejtekre is jellemző volt. SDF-1 $\alpha$  kezelés nem befolyásolta a kemokin receptorok sejt felszíni kifejeződését HeLa sejteken, eltekintve a CXCR4 kifejeződés intenzitásának csökkenésétől.

Megvizsgáltuk az SDF-1 $\alpha$  hatását néhány fontos receptor, ill. sejt felszíni antigén kifejeződésére (LFA-1, ICAM-1, ICAM-3, CD62L, CD62E, TNFR1, TNFR2, Fas/CD95, MHC1, MHC2) is (FACS analízis), de hatást nem tapasztaltunk.

### **A munka kivitelezése körülményeinek alakulása a pályázat során**

A pályázathoz kapcsolódó munkában egy asszisztens és egy TDK hallgató (ELTE) vett részt a szerződésben foglalt személyeken kívül. A hallgató 2004 őszén csatlakozott a laboratóriumhoz (Tumor-Immunológiai Laboratórium), és 2007-ben védte meg diplomamunkáját (ELTE). Egy másik hallgató rövid ideig részt vett a munkában, 2004-ben, de tanulmányi helyzete nem engedte meg, hogy tovább maradjon. Több hazai és külföldi kutató is segítette a munkát, akik nélkül nem lett volna lehetséges ennek a kis költségvetésű pályázatnak a kivitelezése. A munkát néhány körülmény kedvezőtlenül befolyásolta. Az egyik résztvevő más feladatai miatt 2004-től egyre kevesebbet tudott a munkában részt venni. 2005 végén az OGYK-ban a Tumor-Immunológiai és az Őssejt-Biológiai Laboratóriumot egyesítették, ez nem okozott fennakadást, de 2007 első felében nyilvánvalóvá vált, hogy az OGYK-t megszüntetik. A belső átrendeződés, munkaerő-átcsoportosítás a munkának nem tett jót. Egy másik pályázatban, amelyben a témavezető intézeti projekt koordinátor volt, és amelyben a kísérletes munka a két érintett résztvevő osztályon nem megfelelően haladt előre, a témavezető szükségesnek érezte, hogy a munka kivitelezésébe manuálisan is bekapcsolódjon még 2006 második felétől kezdve (ELISPOT mérések, értékelések kivitelezésével, kísérletek irányításával).

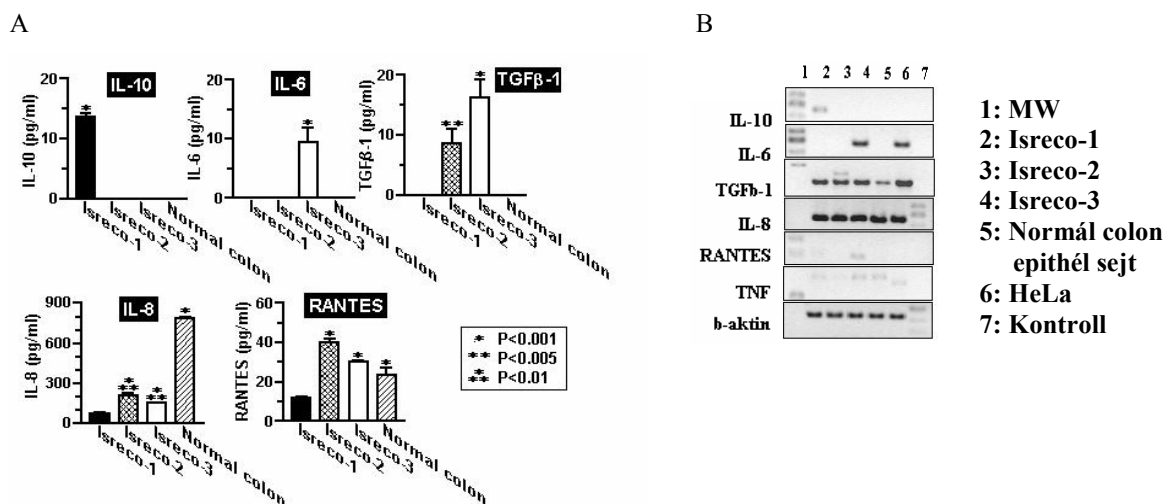
A témavezető munkahelye 2007. szeptember elsejétől megszűnt, ezért a pályázaton való munkát 2007. szeptember elsejétől befejezettnek tekintette. Tervei között szerepel a le nem közölt eredmények publikációja megfelelő intézményes keretek között. Kéri, hogy az OTKA Bizottság engedélyezze, hogy 2 éven belül e témában született publikációi részét képezhessék jelen zárójelentésének.

## **A kísérleti eredmények leírása**

### Konstitutív citokin és kemokin termelés és génexpresszió vizsgálata colorectális adenocarcinoma sejtvonalakon

Kísérleteinkben összehasonlítottuk egy primer humán colorectális adenocarcinomából (Isreco-1), és ugyanezen beteg máj- (Isreco-2) és peritoneális metasztázisaiból (Isreco-3) létrehozott tumor sejtvonalak, valamint egy normál colon epitheliális sejtvonala konstitutív citokin szekrécióját (TNF, IL-10, IL-6, IL-8, RANTES, TGF- $\beta$ 1) ELISA teszttel ( $2 \cdot 10^5$  sejt/ml, 24 óra, 37C<sup>o</sup>). Az mRNS expressziót RT-PCR-rel vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a konstitutív IL-8 termelés a primer tumor sejtvonalon volt a legalacsonyabb, ennek két-, ill. háromszorosa volt mérhető a peritoneális és a máj metasztázis vonalakon (1A. ábra). A normál colon epitheliális sejtek ezen értékek többszörösének megfelelő IL-8-at termeltek. Kis mennyiségű RANTES konstitutív szekrécióját ki tudtuk mutatni az Isreco-2, Isreco-3 sejtekben és normál colon epitheliális sejtekben egyaránt. Kis mértékű konstitutív IL-6 szekréció csak a peritoneális metasztázisból nyert Isreco-3 sejtekben volt detektálható. Mind a máj, mind a peritoneális áttétből létrehozott tumor sejtvonalak termeltek TGF- $\beta$ 1-et, szemben a primer tumor sejtvonallal. Konstitutív TNF szekréció nem volt detektálható egyik sejtvonalon sem. Kisfokú IL-10 termelődés a primer tumor sejtvonala volt jellemző. A fehérje szekréció legtöbb esetben megfelel az mRNS expresszió eredményeinek. Az IL-6 génexpresszió kimutatható csak az Isreco-3 sejteken, az IL-10 génexpresszió csak az Isreco-1 sejtvonala jellemző. A kis mértékű TNF génexpresszió és nagy fokú IL-8 génexpresszió minden vizsgált sejtvonala jellemző. A RANTES génexpresszió csak az Isreco-3 sejtvonala jellemzi (1B. ábra). A HeLa sejt felülúszójában IL-6-ot, IL-8-at detektáltunk ELISA-val.

Mindez arra utal, hogy a primer és a metasztatizáló colorectális tumor sejtek eltérő citokin/kemokin termelő profillal rendelkeznek. A colorectális adenocarcinoma metasztázis tumor sejtjeire inkább jellemző egyes kemokinek (IL-8, RANTES) és immunszuppresszív citokinek (TGF- $\beta$ 1) termelése, mint a primer daganatsejtekre. A primer tumor sejtek is termelnek azonban a celluláris immunválasz szempontjából kedvezőtlen hatású citokint (IL-10).



**1. ábra.** Konstitutív citokin termelés tumor sejtekben. 1A: ELISA; 1B: RT-PCR

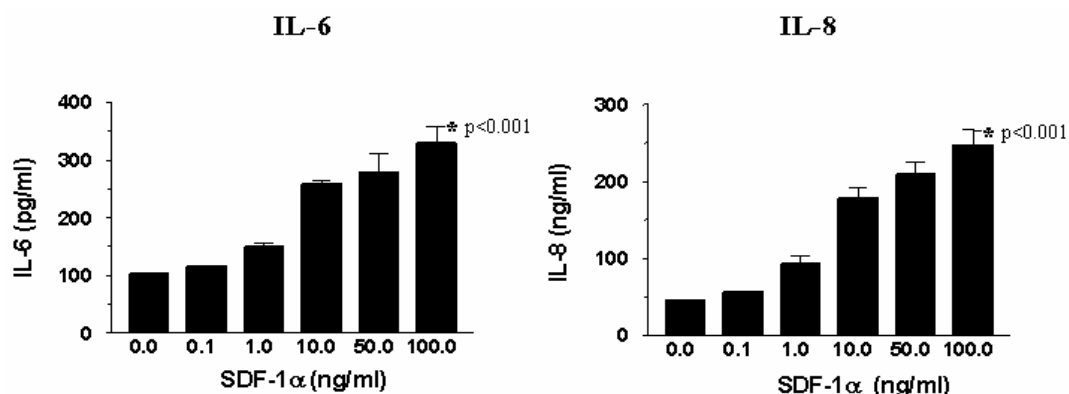
SDF-1 $\alpha$  hatása citokinek, kemokinek termelésére, génexpressziójára colorectális adenocarcinoma sejtvonalakban, HeLa sejtekben

Az SDF-1 $\alpha$  dózis- (0.1, 1, 10, 50, 100 ng/ml) és időfüggő (2, 4, 8, 24 óra) módon fokozta a HeLa sejtekben az IL-8 és az IL-6 termelést (2. ábra, A, B), mely 4, ill. 8 órára érte el maximumát (sejtkultúra felülúszóból végzett ELISA) (IC50: 1-10 ng/ml között). Az SDF-1 $\alpha$  hatását RT-PCR-rel, majd szemikvantitatív RT-PCR-rel is megerősítettük (2. ábra, C, D). (A TNF is fokozta az IL-8 és a RANTES termelődést HeLa sejtekben.) Az SDF-1 $\alpha$  kezelésre (100 ng/ml, 24 óra, 37C°) a HeLa sejtek kemotaxissal válaszoltak, melyet 0.8  $\mu$ m átmérőjű pórusméretű Transwell kamrákban mértünk (3. ábra) kristályibolya festést követő mikroszkópos látótérben történő számolással, valamint a pórusokon átjutott sejtek tripszinizálását követő számolásával.

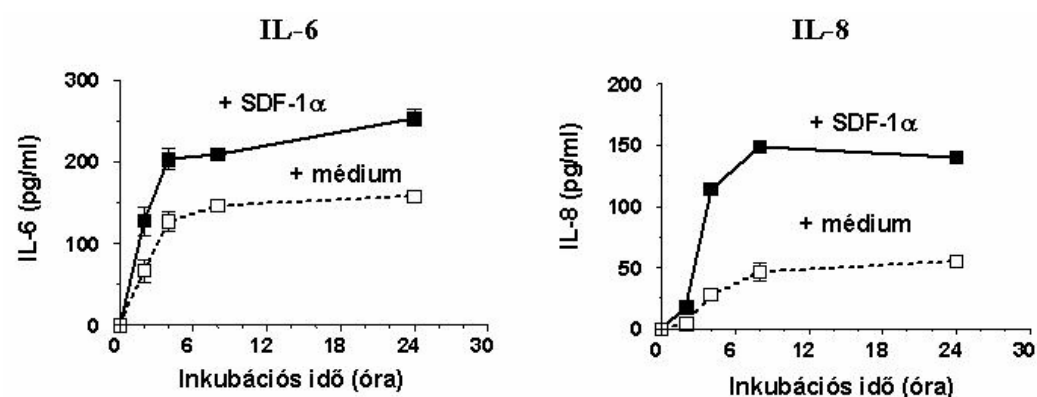
Az SDF-1 $\alpha$  kezelés (100 ng/ml, 24 h) fokozta az Isreco-1 primer vastagbél-daganat sejtől származó sejt vonalban az IL-8 szekréción, mely hatás kisebb mértékben a normál colon epitheliális sejteken is kimutatható volt (4. ábra). A hatás a génexpresszió szintjén is érvényesült, bár az RT-PCR módszer eredményeit fenntartással kell kezelni. Szemikvantitatív RT-PCR-rel megismételve a mérést, a kezeletlen és az SDF-1 $\alpha$ -val kezelt kultúrák közötti különbség jobban szembeötlött Isreco-1 sejtekben (4 óra inkubálás, 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ ). Az SDF-1 $\alpha$  IL-8 termelésre kifejtett hatása metasztatikus Isreco-2 és Isreco-3 sejtekben nem volt kimutatható. Az SDF-1 $\alpha$  kezelés nem befolyásolta a TNF, IL-10, IL-6, RANTES és TGF-1 $\beta$  szekréción a colorectális daganat- és a normál colon epitheliális sejteken.

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy az SDF-1 $\alpha$  befolyásolhatja a tumor sejtekben a neovaszkularizációt fokozó egyes citokinek termelését, ami hozzájárulhat metasztatikusok kialakulásához. A vizsgált vastagbél-daganat sejtek közül ez a primer tumor sejtekre jellemző hatás, a metasztatikus vonalakban már konstitutívan is jelentősen emelkedett e citokinek termelése.

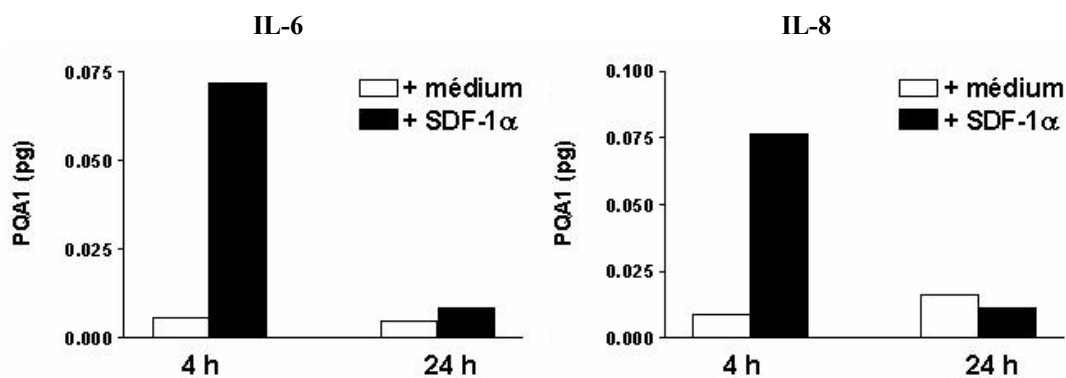
A



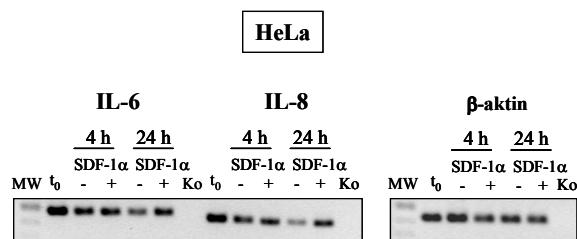
B



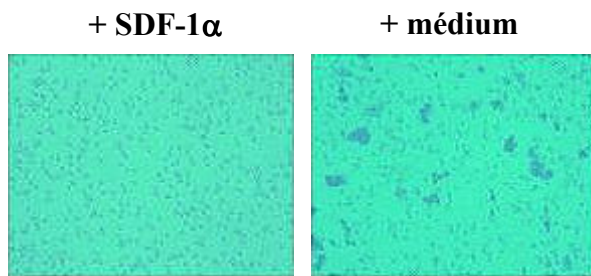
C



D

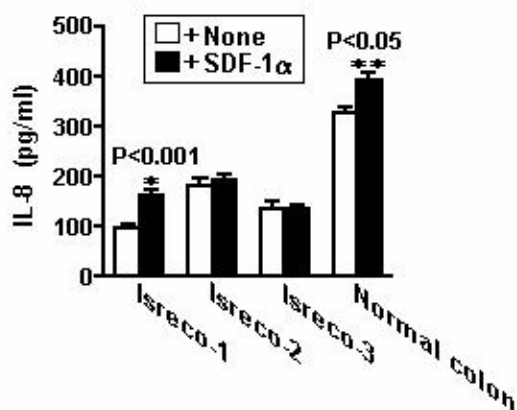


2. ábra. SDF-1α hatása HeLa sejtek IL-6 és IL-8 termelésére. 2A: Dózisfüggés, ELISA. 2B: időfüggés, ELISA. 2C: génexpresszió, szemikvantitatív RT-PCR. 2D: RT-PC



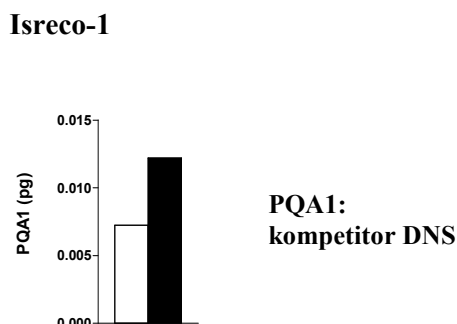
3. ábra. HeLa sejtek kemotaxisa SDF-1 $\alpha$  kezelés hatására

A

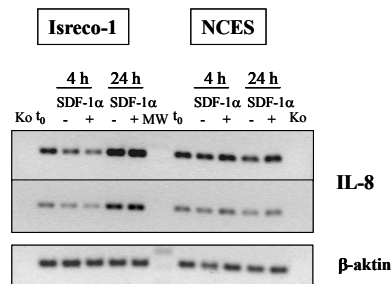


4. ábra. SDF-1 $\alpha$  hatása colorectális daganatsejtek és normál colon epitheliális sejtek (NCES) IL-8 termelésére. 3A: ELISA. 3B: Isreco-1: génexpresszió, szemikvantitatív RT-PCR (4 óra kezelés). 3C: Isreco-1, NCES, RT-PCR

B



C



NCES: normál colon epitheliális sejt

#### Kemokin receptorok kifejeződése colorectális adenocarcinoma sejteken és HeLa sejtek sejteken

Immunfluoreszcenciával megvizsgáltuk tripszinizált HeLa sejteken különböző kemokin receptorok sejt felszíni kifejeződését (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR3, CXCR4; ligandumok: RANTES, IL-8, MIG, IP10, ITAC, MCP1,-2,-3,-4,-5, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , HCC1, HCC2, HCC4, MEC, MPIF1/CCL23, eotaxin, eotaxin-2, -3, GCP2, SDF-1 $\alpha$ ) (FACS analízis). Egyedül a CXCR4-et, az SDF-1 $\alpha$  receptorát sikerült kimutatni a sejteken (5. ábra). Az összes sejt hordozta a

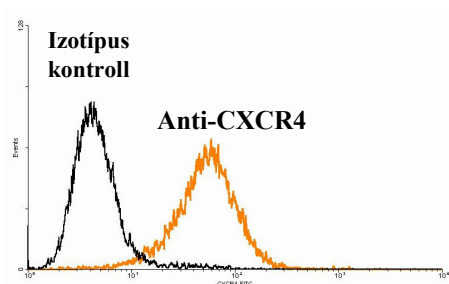
receptort. A tripszinnel vagy a nélkül a plastik felszínről leválasztott colorectális sejteken a FACS kísérletek nem voltak eredményesek. Konfokális mikroszkóp segítségével azonban az összes colorectális sejtvonalon kimutattuk a CXCR4-et (6. ábra). E tekintetben nem különböztek a primér daganatból származó az Isreco-1, és a máj, ill. peritoneális tumorból származó Isreco-2, Isreco-3 sejtek, valamint a normál colon epitheliális sejtek.

RT-PCR segítségével megvizsgáltuk néhány más, metasztázisok kialakulásában esetleg fontos kemokin receptor, így a CCR7, CCR10 génexpresszióját (ezek ellen antitestet nem sikerült beszerezni), negatív kontrollként a CCR3, CCR5, pozitív kontrollként a CXCR4 génexpresszióját is elemeztük. A CCR3, CCR5 expresszióját egyik vizsgált sejtvonalban sem, a CXCR4 expresszióját minden sejtben kimutattuk (7. ábra). Úgy tűnik, mintha az expresszió mértéke az SDF-1 $\alpha$  biológiai hatásának mértékével párhuzamos lenne. A CCR7 génexpresszió mindegyik sejt típusban kimutatható volt, szintje a primer Isreco-1 sejteken és a normál colon epitheliális sejteken alacsonyabbnak, míg a metasztatikusan Isreco-2 és -3 sejteken, valamint HeLa sejteken magasabbnak tűnt (7. ábra). A CCR10 génexpresszió csak a HeLa sejtekre volt jellemző.

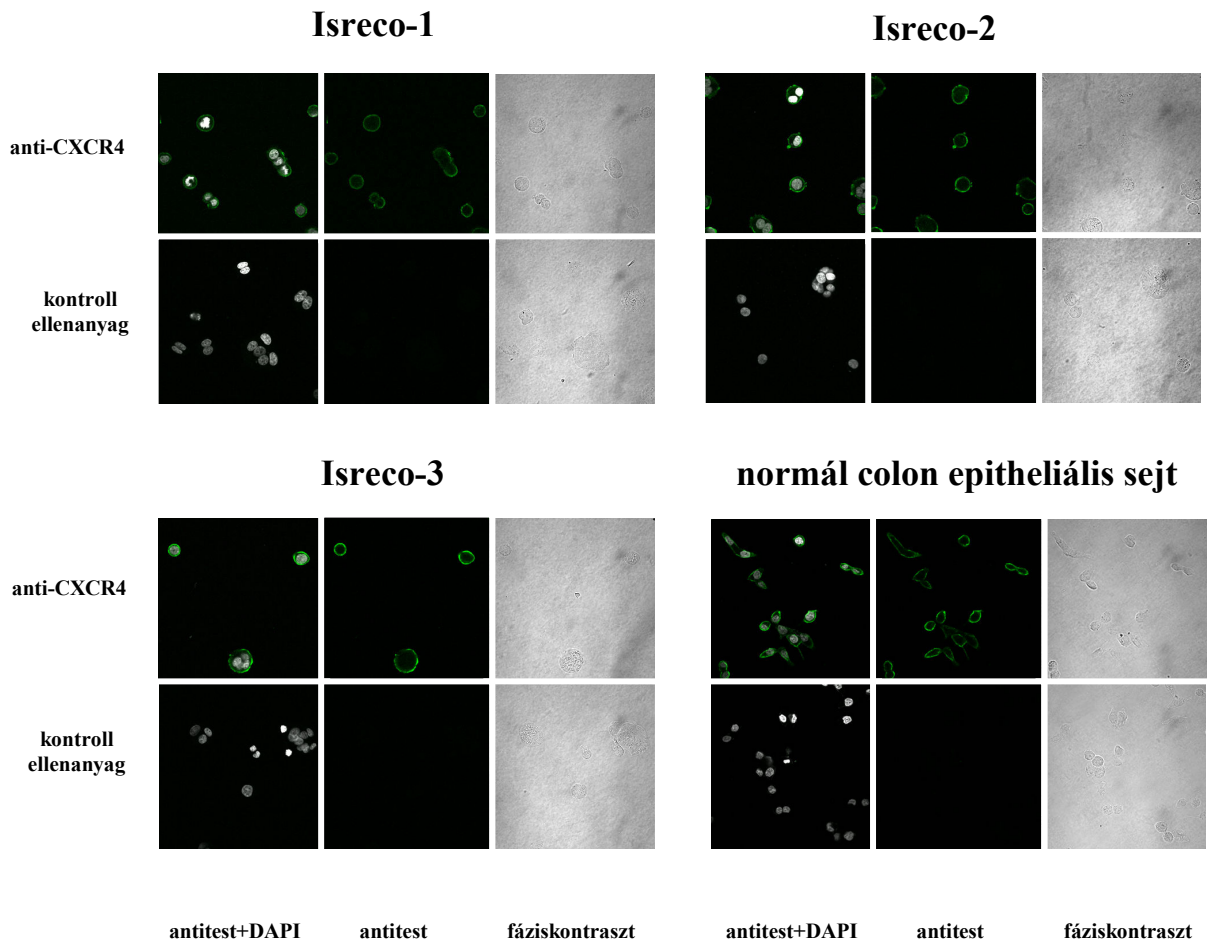
SDF-1 $\alpha$  kezelés (100 ng/ml, 24 óra) nem befolyásolta a kemokin receptorok sejt felszíni kifejeződését, eltekintve a CXCR4 kifejeződés intenzitásának csökkenésétől.

Összességében elmondható, hogy az SDF-1 $\alpha$  biológiai hatását megalapozó funkcionális CXCR4 receptorokat sikerült detektálni HeLa és colorectális sejteken, de CXCR4 azokon a sejteken (Isreco-2, -3 sejtek) is rajta volt, melyekben az SDF-1 $\alpha$  nem idézte elő az IL-8 termelés fokozását. Talán belső, gátló mechanizmusok akadályozzák a jelátvitelt ezekben a sejtekben, de más okok is közrejátszhatnak.

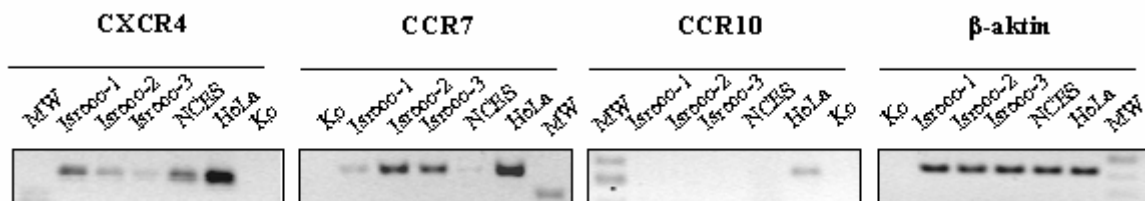
#### 5. ábra. CXCR4 kifejeződés HeLa sejteken







**6. ábra.** CXCR4 kifejeződés colorectális daganatsejteken, normál colon epitheliális sejteken. (zöld: CXCR4, fehér: DAPI/sejtmag, konfokális mikroszkóp)

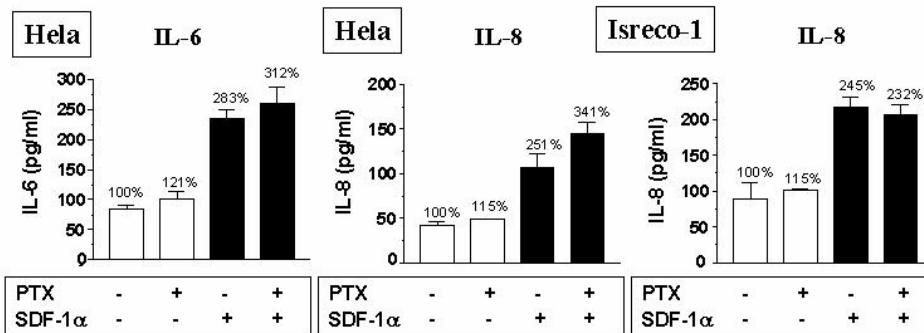


**7. ábra.** CCR7, CCR10 génexpresszió colorectális daganatsejteken, normál colon epitheliális (NCES) és HeLa sejteken.

A SDF-1 $\alpha$ -val indukált és a konstitutív IL-6 és IL-8 termelésben szerepet játszó jelátviteli utak

Mivel ismert, hogy a kemokin receptorok többnyire G-protein függő reakciútat aktiválnak, és az irodalmi adatok alapján a kemotaxis kísérletekben ez az út többnyire pertussis toxin (PTX), szenzitívnek bizonyult CXCR4 esetében is, megvizsgáltuk a PTX hatását a HeLa és Isreco-1 sejtek

konstitutív, valamint SDF-1 $\alpha$ -val stimulált IL-6 (csak HeLa sejtekben) és IL-8 termelésére (HeLa és Isreco-1 sejtekben). (PTX célpontjai: G $\alpha$ i-1, G $\alpha$ i-2, G $\alpha$ i-3, G $\alpha$ 0A, G $\alpha$ 0B, G $\alpha$ t1, G $\alpha$ t2.) A sejteket PTX-szel (100 ng/ml) vagy médiumban kezeltük elő (1 óra), ezután egyszer átmostuk, majd folytatólag SDF-1 $\alpha$ -val vagy friss médiummal folytattuk az inkubálást 24 órán át PTX jelenlétében vagy a nélkül. Ezután a sejt kultúra felülúszókban ELISA-val mértük a citokinek szintjét. A PTX toxikus hatását nem tapasztaltuk, ezt MTT teszttel ellenőriztük párhuzamosan kezelt kultúrákban. Az abszolút sejtszámot tripánkék jelenlétében végzett számolással határoztuk meg. A PTX nem gátolta sem a konstitutív, sem az SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL6 és IL-8 termelést (8. ábra). Ez jelenség (amennyiben a G-proteinek kikerüléséről van szó) nem lenne precedens nélküli a kemokin receptorok, a CXCR4 esetén. Más G-protein gátlószereket nem állt módunkban megvizsgálni.

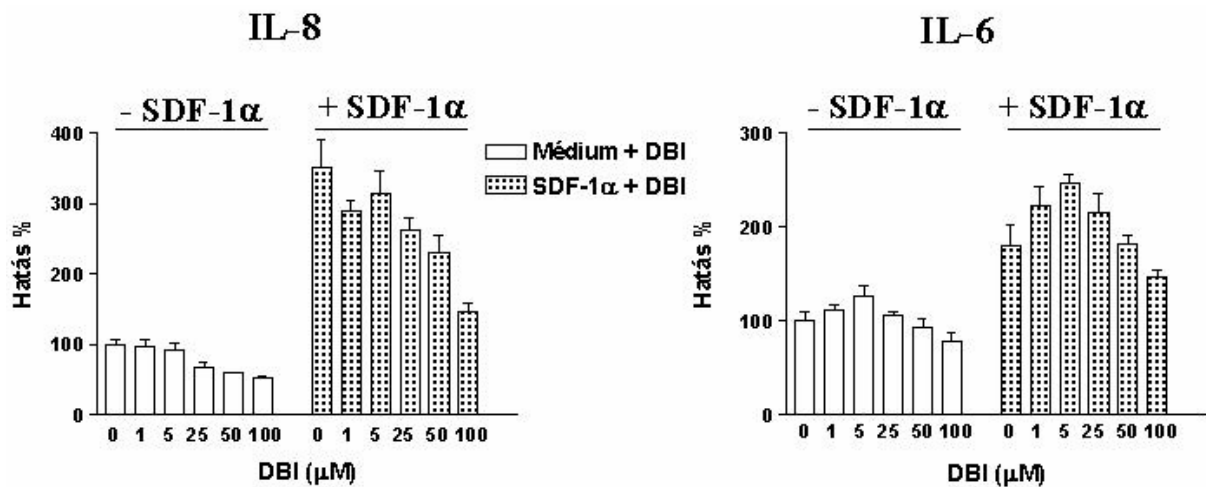


**8. ábra.** Pertussis toxin hatása az IL-6 és IL-8 termelésre HeLa, ill. Isreco-1 sejtekben (PTX: 100 ng/ml, 1 óra előkezelés, majd 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ -val 24 óra; ELISA)

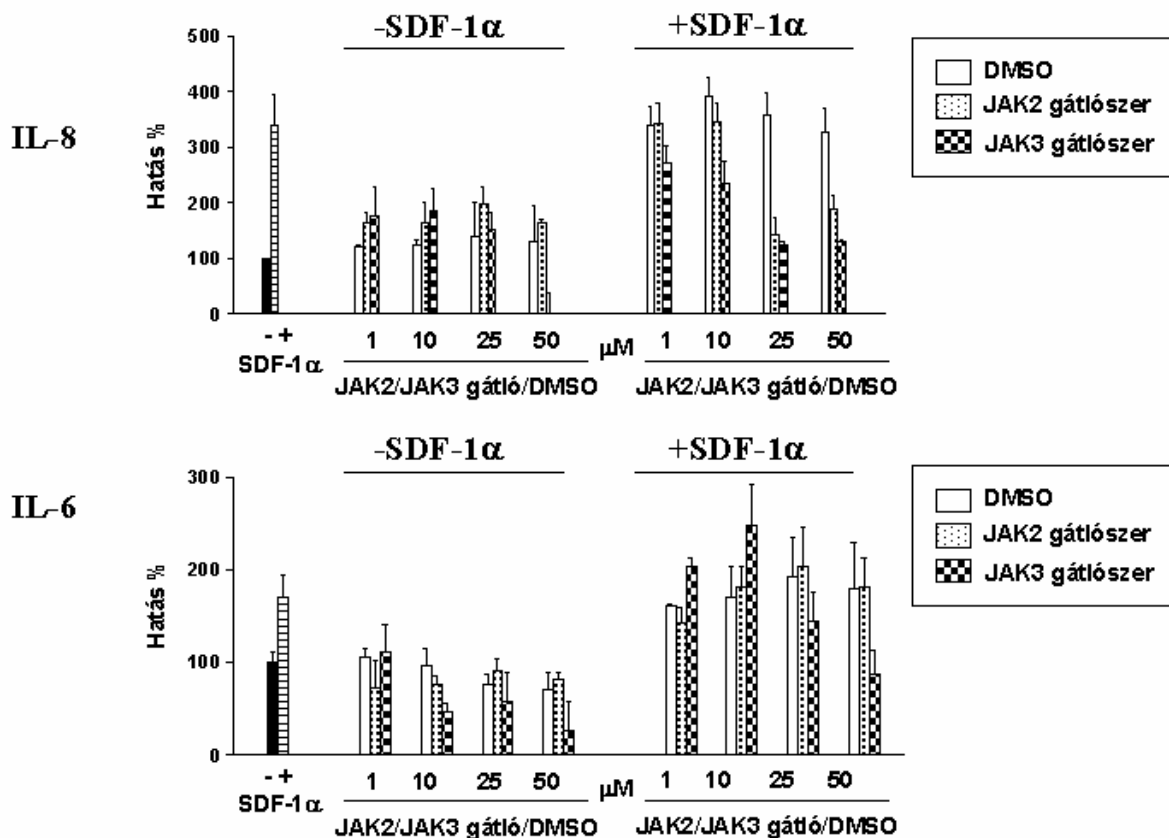
A továbbiakban a JAK, a MAPK, ezen belül a p38, ERK1/ERK2, JNK/SAPK, továbbá, NF $\kappa$ B, és src kináz útvonalak szerepét próbáltuk feltérképezni gátlószerek segítségével HeLa sejtek konstitutív és SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL-6 és IL-8 termelésében. A sejteket 1 órán át (egyes esetekben 2 órán át) előkezeltek a gátlószerekkel, ill. a megfelelő oldószert tartalmazó médiummal, majd az SDF-1 $\alpha$  kezeléskor (24 óra, 100 ng/ml) a fent leírtak alapján jártunk el. A gátlószereket több dózisban alkalmaztuk, a relatív túlélést MTT teszttel, az abszolút sejtszámot tripánkék jelenlétében végzett számolással határoztuk meg. Csak azoknál a dózisoknál nyert eredményt vettük figyelembe, melyeknél toxicitást nem észleltünk.

A JAK/STAT útvonalat egy általános JAK gátlószert, de főképpen JAK1 gátlószert, a DBI (JAK inhibitor I, target: JAK1 [JAK2, JAK3]), egy JAK2 gátlószert, az AG490 és egy JAK3 gátlószert, a WHI-P131 (JAK3 inhibitor I) segítségével vizsgáltuk. A DBI dózisfüggően gátolta az IL-8 konstitutív termelését, és az SDF-1 $\alpha$  IL-8 termelésre kifejtett hatását (maximális gátlás, 100  $\mu$ M dózissal 42,9%, ill. 81,6%) (9. ábra). Az IL-6 termelést nem befolyásolta jelentősen.

A konstitutív IL-8 termelés JAK3 függő (maximális gátlás 50  $\mu\text{M}$  dózissnál 100%), a JAK2-nek nincs benne szerepe (10. ábra). Ugyanez mondható el a konstitutív IL-6 termelésről is, bár ott a gátlás kisebb (maximális gátlás 50  $\mu\text{M}$  dózissnál 73,7%). Az SDF-1 $\alpha$  IL-8 termelésre kifejtett serkentő hatását a JAK3 gátlószerrel teljesen gátolni lehet, emellett a JAK2 gátlószerrel is jelentős gátlást lehetett elérni (91,3% maximális dózissnál). Az SDF-1 $\alpha$  IL-6 termelésre kifejtett serkentő hatását a JAK3 gátlószer nagymértékben gátolta (80,9% maximális gátlás). Úgy tűnik tehát, hogy a JAK3 (IL-6, IL-8) és a JAK2 (IL-8) útvonalak aktiválódnak az SDF-1 $\alpha$  hatására. A JAK szerepét Isreco-1 sejtekben is megerősítettük.



**9. ábra.** DBI (JAK inhibitor I) hatása HeLa sejtek konstitutív és SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL-8 és IL-6 termelésére. (DBI targetjei: JAK1, [JAK2, JAK3])

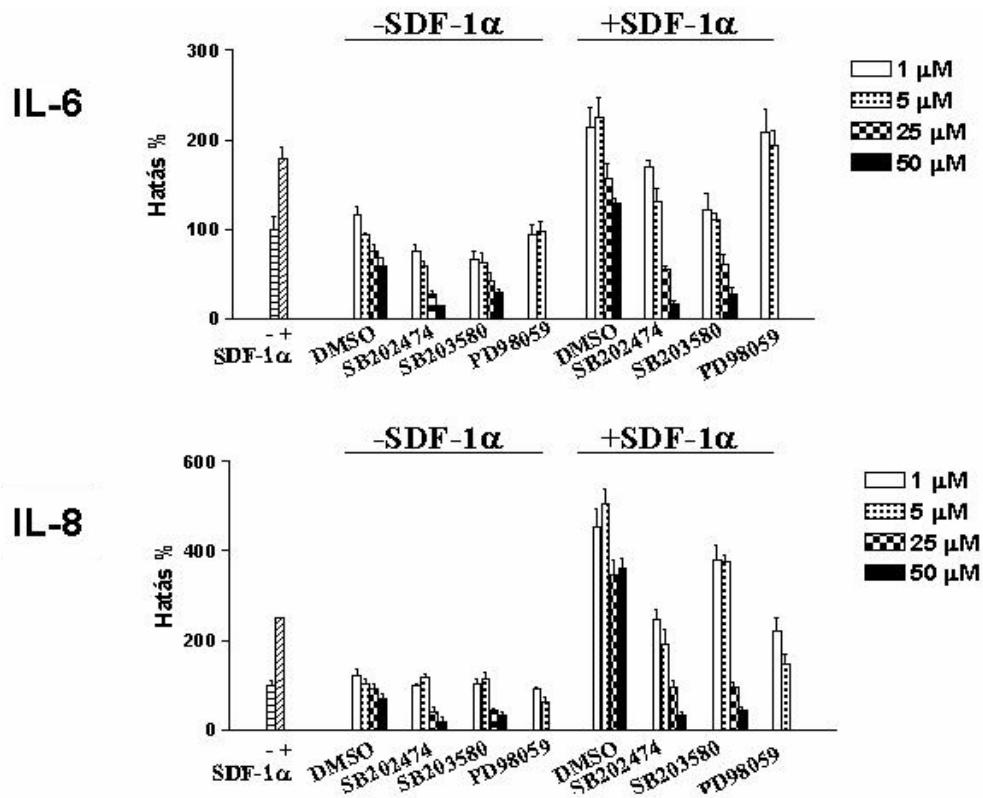


**10. ábra.** JAK2 (STAT3) inhibitor (AG490) és JAK3 inhibitor (WHI-P131) hatása HeLa sejtek konstitutív és SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL-8 és IL-6 termelésére.

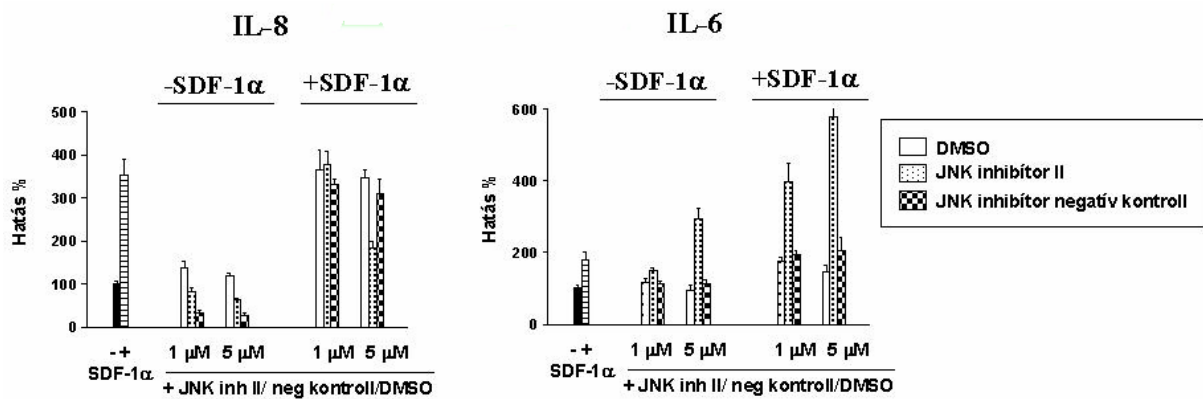
A MAPK útvonalakat egy p38 MAPK gátlószert, az SB203580 (negatív kontroll vegyülete: SB202474), egy MEK/ERK inhibitor, a PD98059, és egy JNK/SAPK gátlószert, a SP600125/JNK inhibitor II (negatív kontroll vegyülete: SAPK inhibitor II) segítségével vizsgáltuk.

A p38 gátlószert IL-8 és IL-6 termelésre kifejtett hatása egyik esetben sem haladta meg a negatív kontroll vegyület hatását (11. ábra). A MEK/ERK inhibitor PD98059 ezt meghaladó mértékben, 25  $\mu$ M dózistól kezdve teljesen gátolta mindkét citokin minden esetben, azonban ez a hatás igen közeli a kontroll vegyületéhez, ezért nem tudjuk biztosnak elfogadni.

Az SP600125 JNK inhibitor a kontroll vegyülettől eltérően gátolja az SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL-8 termelést (5  $\mu$ M SP600125: 70,4%-os gátlás, 5  $\mu$ M negatív kontroll/SAPK inhibitor II: 18,5%-os gátlás) (12. ábra). Érdekes módon, az SP600125 JNK inhibitor ugyanakkor stimulálta az SDF-1 $\alpha$ -val indukált IL-6 termelést (5  $\mu$ M SP600125: 700%-os növekedés, 5  $\mu$ M negatív kontroll/SAPK inhibitor II: 83,3%-os növekedés).

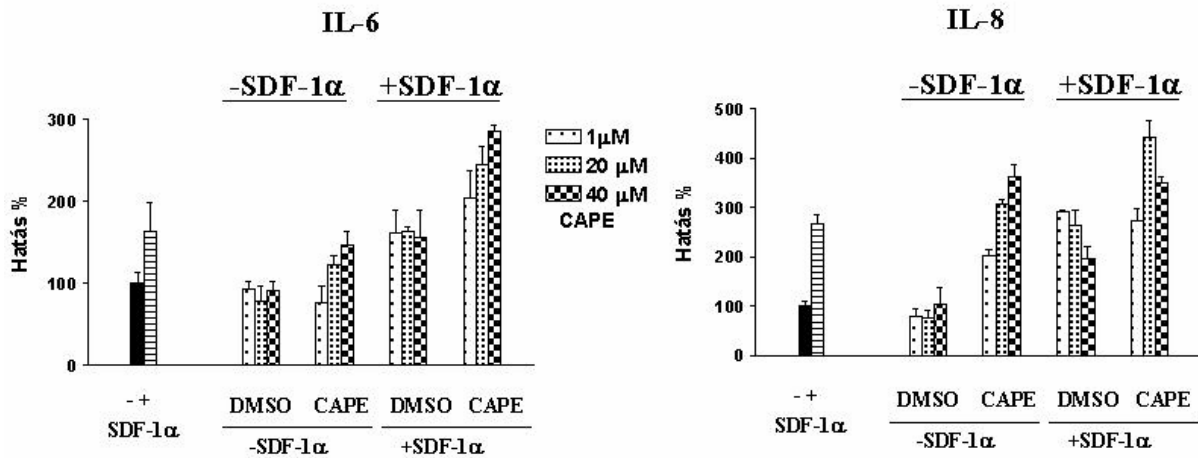


**11. ábra.** MAPK inhibitorok hatása HeLa sejtek IL-6 és IL-8 termelésére. (SB203580: p38 MAPK inhibitor; SB202474: negatív kontroll; PD98059: MEK/ERK inhibitor)

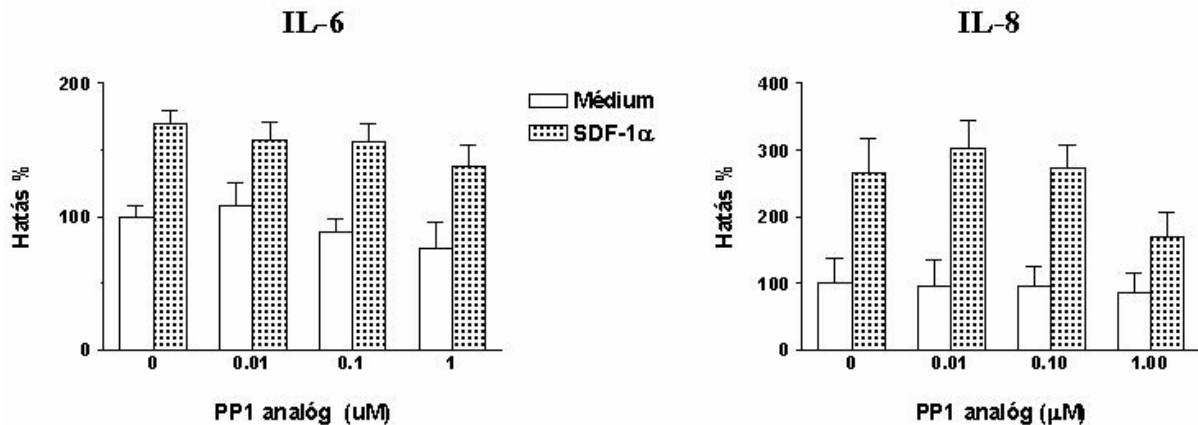


**12. ábra.** JNK inhibitor hatása HeLa sejtek IL-6 és IL-8 termelésére. (SP600125: JNK inhibitor II; negatív kontroll vegyület: SAPK inhibitor II)

Az NFκB gátló CAPE nem gátolta, hanem kis mértékben serkentette a konstitutív és az SDF-1α-val indukált IL-6 és az IL-8 termelést (13. ábra). Az src kináz gátlószere közepesen gátolta (1 μM PP1: 48%-os gátlás) az IL-8 termelés SDF-1α-val kiváltott stimulációját (14. ábra).



13. ábra. NFκB inhibitor hatása HeLa sejtek IL-6 és IL-8 termelésére. (CAPE: NFκB inhibitor)



14. ábra. Src gátlószere hatása HeLa sejtek IL-6 és IL-8 termelésére. (PP1 analóg: src gátlószere)

### Következtetések

Kimutattuk, hogy a colorectális daganat sejtek számos, funkcionális szempontból fontos citokint, így IL-8-at, IL-10-et, IL-6-ot, RANTES-t, TGFβ-1-et termelnek, azonban jelentős kvalitatív és kvantitatív különbségeket észleltünk a primer és a metasztatizáló colorectális daganatsejtek között, valamint az eltérő helyen kialakult metasztatizisokból származó daganatsejtek között. A normál colon epitheliális sejtek és a daganat sejtek citokin mintázata között hasonlóság van, ami abban is

megnyívnál, hogy egyes, a normál colon epitheliális sejtekre jellemző citokinek (pl. IL-8, RANTES) termelése a tumor sejtekben megtartott. Az SDF-1 $\alpha$  szolid tumor sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatára alkalmas modellt találtunk. Az SDF-1 $\alpha$  serkenti a neovaszkularizációt, tumor növekedést serkentő citokin, az IL-8 termelését colorectális daganatsejtekben, ami jelentős tényező lehet a primer tumor progressziójában. A primer tumor sejtekhez képest a máj és nyirokcsomó metasztázisból származó sejtek több IL-8-at termelnek, ugyanakkor az SDF-1 $\alpha$  nem serkenti az IL-8 termelését bennük. Az SDF-1 $\alpha$ -val kiváltott IL-8 válasz nem kizárólagos sajátja a vastagbél daganatos sejteknek, mert HeLa sejtekben, és kisebb mértékben normál colon epitheliális sejtekben is észlelhető az IL-8 termelésre kifejtett hatása. Az IL-8 nem az egyetlen citokin, amelynek termelődése SDF-1 $\alpha$  hatására emelkedhet tumor sejtekben, mert HeLa sejtekben például az IL-8 mellett az IL-6 termelés emelkedése is megfigyelhető. Ez azt mutatja, hogy az SDF-1 $\alpha$  regulátor szerepe nemcsak a tumor sejtek migrációjának irányításában nyilvánulhat meg, amely egyébként ugyancsak megfigyelhető HeLa sejtekben, hanem a tumor sejtek egyéb élettani funkcióinak befolyásolásában is. Az SDF-1 $\alpha$  hatását CXCR4 receptorokon keresztül fejt ki, ezek jelenlétét (fehérjét és génterméket) igazoltuk minden SDF-1 $\alpha$ -ra reaktív sejtvonalon. Úgy tűnik azonban, hogy ez a receptor jelen van mindkét, IL-8 választ nem mutató, metasztázisokból származó colorectális daganatsejten is. Lehetséges, hogy e sejteken a CXCR4 receptorok nem funkcionálisak. A CXCR4 mellett a CCR7-et (génterméket) is kimutattuk minden vastagbél eredetű sejtvonalon és a HeLa sejteken. Ezzel szemben a CCR10 egyedül a HeLa sejtekre volt jellemző az összes vizsgált sejt közül. A CCR7-et (liganduma a CCL19/ELC) a CXCR4-gyel együtt regionális nyirokcsomó-, tüdő-, csontáttétékkel, a CCR10-et (liganduma a CCL21/SLC) bőráttekkel hozták kapcsolatba egyes tumorokban.

Az SDF-1 $\alpha$  CXCR4-en keresztül történő IL-8 és IL-6 termelésére kifejtett hatásának jelátviteli útja a G-protein család jellegzetes, pertussis toxinnal gátolható tagjaitól függetlennek bizonyult. Ugyanakkor a JAK/STAT út vonal bizonyosan érintve van. Az IL-8 esetében a JNK (MAPK) is részt vesz a folyamatban, és kisebb szerepe az src kináznak is lehet.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy az SDF-1 $\alpha$  szerepe túlmutat a sejtmigrációra gyakorolt hatáson, fontos szerepet játszik a sejtek citokin termelésének modulációjában tumor sejtek esetében. Mindez azt sugallja, hogy az SDF-1 $\alpha$ , tumor-mikrokörnyezeti faktorként sokoldalú funkciót tölthet be, alapvető szerepet játszhat nemcsak a tumor sejtek szervspecifikus „homingjában”, hanem a tumor sejtek környezetük felé továbbított jeladásában is, a környezetnek a tumor fenntartására irányuló ráhangolásában.

## **Hasznosíthatóság**

Általánosságban, a tumor sejtek konstitutív citokin termelésének mérése az egyedi tumorokban hozzásegíthet egy jobb, célzottabb bioterápia kifejlesztéséhez.

- Kísérleteink az SDF-1 $\alpha$  tumor mikro környezetből való lokális eliminálásának szükségessége irányába mutatnak. Ehhez előbb még igazolni kellene (többek között), hogy az SDF-1 $\alpha$  in vivo is kifejti ezeket a hatásokat a colorectális daganatok mikro környezetében, ill., hogy valóban számottevő tényezője a tumor-mikro környezetnek.
- Kísérleteink arra utalnak, hogy a CXCR4 és a CCR7 specifikus elemekkel társítva esetleges célpontja lehet egy célzott, colorectális daganatsejtek eliminálására irányuló terápiának. E receptorok működésének szelektív gátlása a tumor sejteken ugyancsak fejlesztés kiindulópontja lehet.
- Kísérleteink megerősítik, hogy az IL-8 termelés vagy az ehhez szükséges jelátviteli út gátlása fontos célpont lehet vastagbél daganatok kezelésében.

### **A munkával kapcsolatos prezentációk**

A munkánkat három nemzetközi, két hazai és egy TDK (ELTE) konferencián prezentáltuk. Három intézeti (OGYK) szemináriumon is beszámoltunk róluk és a velük kapcsolatos tudományterület újabb eredményeiről. Nemzetközi és magyar szaklapokban két-két összefoglalónk jelent meg. Munkánk egy részét egy angol nyelvű könyvfejezetben publikáltuk. A munkához kapcsolódó, megelőző eredményeinket egy angol nyelvű folyóirat cikkben közzeltük. További cikkek beküldését is tervezzük (lisd. alább).

#### Konferencia részvételek:

1. Pócsik É, Haraszi B, Szlávik A, Sordat B, Varga E. A stromalis sejtől származó faktor 1 alfa (SDF1-alfa) hatása tumor sejtek citokin termelésére. Magyar Immunológia, 2005; 4 (2): 35-36. Előadás. MIT XXXV. Vándorgyűlése, 2005. október 19-22., Sopron
2. Varga E, Haraszi B, Szlávik A, Sordat B, Pócsik É. A konstitutív citokin termelés jellemzése primer humán colorectális tumorból, valamint a máj és peritoneális metasztatizisaiból származó sejtvonalakon. Magyar Immunológia, 2005; 4 (2): 43. Poszter-előadás. MIT XXXV. Vándorgyűlése, 2005. október 19-22., Sopron
3. Varga E, Haraszi B, Szlávik A, Sordat B, Pócsik É. A konstitutív citokin termelés összehasonlítása és a stromalis sejt eredetű faktor 1 alfa (SDF1-alfa) hatásának jellemzése humán tumor (primer és metasztatikus) sejteken valamint a máj és peritoneális metasztatizisaiból származó sejtvonalakon. Poszter. ELTE, Biológus TDK Konferencia, 2005. november 24-25., Budapest
4. Pócsik É, Varga E, Haraszi B, Sordat B, Laskay T, Rot A. Pattern of cytokine production in cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinomas. Eur. Cyt. Network 2006; 17 Poszter. 6<sup>th</sup> International Cytokine Conference (6<sup>th</sup> Joint Conference of the International Cytokine Society, International Society for Interferon and Cytokine Research, and European Cytokine Society), 2006. augusztus 27-31., Bécs, Ausztria
5. Pócsik É, Varga E, Haraszi B, Sordat B, Laskay T. Constitutive and stromal cell-derived factor-1 alpha-induced cytokine production by cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinoma cells.



Poszter-előadás. 14<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW 2006), 2006. október 21-25., Berlin, Németország

6. Varga E, Haraszti B, Sordat B, Laskay T, Pócsik É. Constitutive and stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1alpha)-induced cytokine production by primary and metastatic human colorectal cancer cell lines.

Poszter. International Conference of Immunogenomics and Immunomics [Joint Meeting of the 2<sup>nd</sup> Basic and Clinical Immunogenomics and 3<sup>rd</sup> Immunoinformatics (Immunomics) Conferences)], 2006 október 8-12., Budapest

#### Publikált közlemények:

##### Könyvfejezet:

1. Pócsik É, Varga E, Haraszti B, Sordat B, Laskay T, Rot A. (2006)  
Pattern of cytokine production in cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinomas. *In: „Proc. of the 6<sup>th</sup> International Cytokine Conference”* (Ed. by JD Schwarzmeier), Medimond S.r.l. Monduzzi Editore International Proceedings Division, Bologna, appendix, pp. 1-4 (G827C0298).

##### Folyóiratközlemény:

1. Csiszár A, Szentes T, Haraszti B, Balázs A, Petrányi G Gy, Pócsik É. The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma, *Pathol. Oncol. Res.* 2004; 10 (2): 109-116., 2004

##### Absztrakt:

##### Nemzetközi szaklapban:

1. Pócsik É, Varga E, Haraszti B, Sordat B, Laskay T, Rot A. Pattern of cytokine production in cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinomas. *Eur. Cyt. Network* 2006; 17 (Suppl.): 96. (IF<sub>2005</sub>: 1.073)

2. Pócsik É, Varga E, Haraszti B, Sordat B, Laskay T. Constitutive and stromal cell-derived factor-1 alpha-induced cytokine production by cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinoma cells. *Gut* 2006; 55 (Suppl. V): A185. (IF<sub>2005</sub>: 7.692)

##### Magyar folyóiratban:

1. Pócsik É, Haraszti B, Szlávik A, Sordat B, Varga E. A stromalis sejtből származó faktor 1 alfa (SDF1-alfa) hatása tumor sejtek citokin termelésére. *Magyar Immunológia*, 2005; 4 (2): 35-36.

2. Varga E, Haraszti B, Szlávik A, Sordat B, Pócsik É. A konstitutív citokin termelés jellemzése primer humán colorectális tumorból, valamint a máj és peritoneális metasztázisaiból származó sejtvonalakon. *Magyar Immunológia*, 2005; 4 (2): 43.

##### Szakedolgozat:

1. Varga Erzsébet. Konstitutív és stróma-sejt eredetű faktor-1 $\alpha$ -val (SDF-1 $\alpha$ ) indukált citokin termelés jellemzése HeLa sejteken és colorectális daganatokból nyert sejtvonalakon

ELTE, Természettudományi Kar, 2007, Budapest

##### Szemináriumok:

1. Pócsik Éva. Kemokinek szerepe a tumor progresszióban. Stroma sejt eredetű faktor 1- $\alpha$  (SDF1 $\alpha$ ) hatása tumor sejtek citokin termelésére.

Előadás

OGYK, Immunkávé, Budapest, 2005. október 28.

2. Pócsik Éva. Tumor őssejtek.

Előadás

OGYK, Őssejtklub, Budapest, 2006. október 19.

3. Pócsik Éva. Konstitutív és stróma-sejt eredetű faktorról (SDF-1 $\alpha$ ) indukált citokin termelés jellemzése colorectális daganatokból nyert sejtvonalakon és HeLa sejteken.

Előadás

OGYK, Immunkávé, Budapest, 2007. február 9.

A témával kapcsolatos előkészítés alatt álló cikkek:

1. Pócsik É, Varga E, Haraszi B, Sordat B, Rot A and Laskay T. Comparison of pattern of cytokine production in cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinomas.

2. Pócsik É, Varga E, Padányi R, Haraszi B, Laskay T and Gergely P. Differences in functional CXCR4 expression between tumor cell lines derived from primary and metastatic human colorectal carcinoma.

3. Pócsik É, Varga E, Haraszi B and Laskay, T. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) increases tumor cell IL-8 and IL-6 production via JAK/STAT and MAPK dependent pathways.