

## Zárójelentés a „Hisztamin hatása a sejt differenciációra, összehasonlító vizsgálatok tumor - és embrionális őssejteken” című 62558 számú OTKA pályázatról

A hisztaminnak az allergiás reakciókban betöltött szerepe közismert, azonban az utóbbi években egyre több adat gyűlt össze más fiziológiai és kóros folyamatokban játszott fontos szerepéről pl. a tumor proliferációban, sebgyógyulásban, hematopoiesisban és az embriogenezisben betöltött funkcióiról. A hisztamin ill. a HDC biológiai szerepének kutatásában jelentős az Intézetünk által kollaborációban létrehozott HDC génkiütött, ezért hisztaminmentes HDC KO egértörzs. A jelen projekt is eze egértörzsek felhasználására épült. Korábban komplex kémiai és UV-B tumor indukciós protokoll szerint kezeltük a genetikailag hisztamin hiányos Balb/c HDC<sup>-/-</sup> és HDC<sup>+/+</sup> egereket. Az állatokon kialakuló leggyakoribb tumortípus a dermatofibrosarcoma (DFS) volt, mely korábban jelent meg a hisztamin hiányos egerekben. A tumorok szövettani diagnózisa után egy-egy DFS<sup>+/+</sup> és DFS<sup>-/-</sup> tumorból in vitro sejtenyészetet is alapítottunk. Az immunfenotipizálás alapján ezek CD44<sup>+</sup> és CD34<sup>+</sup> sejteknek bizonyultak.

Kísérleteink kiindulópontjaként e sejtenyészetek in vitro jellemzését végeztük el. Első lépésben MTT-assay-al meghatároztuk mindkét sejtvonal viabilitását. A DFS HDC<sup>+/+</sup> és DFS HDC<sup>-/-</sup> sejtvonalak osztódási rátájában nem volt különbség és ez exogén hisztamin hatására sem változott szignifikánsan. Az eredmények tükrében tehát a hisztamin direkt autokrin proliferációt befolyásoló szerepe e tumor típusban kizárható volt.

A következőkben kíváncsiak voltunk arra is, hogy kimutathatóak-e kromoszóma eltérések a sejtvonalak között. Mivel egér karyotipizáláshoz nem találtunk szakértő partnert, ezért csak a számbeli meghatározást tudtuk elvégezni. Mindkét sejtvonal egyformán hipotetraploid, a modális kromoszómaszám: 66.

Kvantitatív RT-PCR-rel az önmegújulási (self-renewal) képességgel kapcsolatos és a Wnt jelátviteli útvonalban szerepet játszó marker gének exszpresszióját vizsgáltuk Taqman-assay-vel. A kísérletek arra irányultak, hogy a hisztamin termelő képesség hiánya (DFS HDC<sup>-/-</sup>), megváltoztatja-e ezen markerek kifejeződését. Kimutattuk mindkét vonalban az Oct4 mRNS hiányát, a Nanog, GSK-3, és a catenin- $\beta$  expresszióját, de ezek, nem függtek a sejtvonalak genotípusától. A PDGFR- $\alpha$  és

CREB1 expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt a hisztamin szintézisre képtelen (DFS HDC -/-) vonalban.

Immuncitokémiai módszerrel mindkét genotípusban „őssejt” markereket is vizsgáltunk az adherens és sferoid tenyészetekben.

A négy csoportban jelet kaptunk Oct4-re, SOX2-re, alkalikus foszfatázra és SSEA-1-re (a beállításhoz pozitív kontrollként egér embrioid body-t használtunk). Az immunfestés nem a sejtek mindegyikére volt egyformán jellemző, hanem inkább csak a sejtek egy csoportja adta a reakciót. A sferoid képző DFS HDC-/- sejtekben a SOX2-t expresszáló sejtek száma jelentősen csökkent.

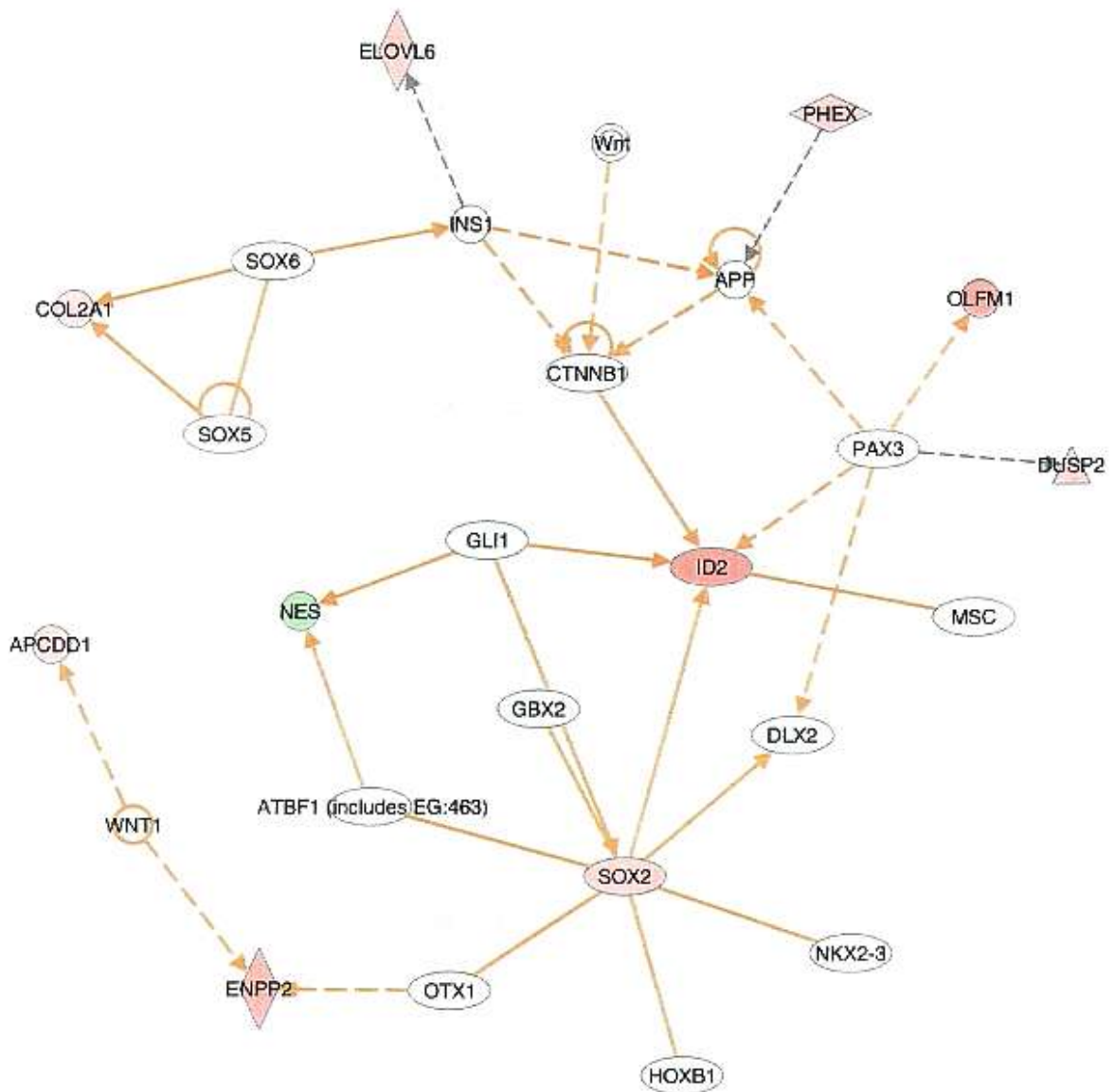
A sejtenyészetekből szelekcióval olyan klónokat hoztunk létre, melyek letapadási igény nélkül sejtaggregátum (tumor sferoid) formájában fenntarthatóak, és morfológiai jellemzőjükben nagyon hasonlítanak az embrionális őssejtekre. Ezekkel in vivo kísérleteket is végeztünk.

Egér syngraft modellben összehasonlítottuk az adherens és a sferoid formában növekvő sejtek tumorképző és proliferációs képességét a genotípusok függvényében. Adataink szerint a sferoid DFS HDC+/+ sejtek növekedési üteme a legnagyobb, ezt követi az adherens DFDS HDC+/, majd a sferoid DFS HDC-/- és adherens DFS HDC-/. A változás azonban csak tendenciát mutatott, de nincs szignifikáns különbség az egyes csoportok között.

A tumorszövetekből RNS-t izoláltunk, és kimutattuk, hogy a Nanog expresszió az adherens sejtekből indított DFS HDC KO tumorokban upregulálódott, a PDGFR $\alpha$ , az uPA, és a PAI-2 expressziója viszont jelentősen nagyobb mértékű a DFS- HDC +/+ tumorokban.

A következőkben Agilent platform használatával 44 000 gén expresszióját hasonlítottuk össze a két különböző genotípusú adherens és sferoid DFS tenyészeteken. Négy biológiai és két technikai párhuzamossal dolgoztunk kétszín jelöléssel.

A DFS HDC+/+ adherens sejtek és a DFS HDC+/+ sferoidok génexpressziós adatainak bioinformatikai feldolgozása után az Ingenuity Pathway Analyser program segítségével kiválasztottuk mind a tumorképzéssel mindpedig a korai egyedfejlődés szabályozásával kapcsolatban álló Wnt szignalizációs útvonalban szereplő géneket.



Majd megvizsgáltuk, hogy a hálózatban szereplő gének között vannak-e olyanok, amelyek expressziója eltért a mi rendszerünkben. Ennek során olyan, a korábbi kísérleteinkben nem vizsgált génekre is fény derült, amelyek a szakirodalom alapján az őssejtek differenciálódásával is kapcsolatba hozhatók. A SOX2 mellett a nestin, az Id2, a COL2A1, az ENPP2, az OLFM1, a PHEX, a DUSP2, ELOVL6 expressziója volt eltérő az adherens és a sferoid sejtekben.

Ez utóbbiak közül a nestin és az Id2, a SOX2 és a Col2A1 real-time PCR-rel, illetve az Id2, a SOX2 és a Col2A1 Western blottal történő validálását végeztük el. Ennek során a SOX2 és az Id2 expresszióváltozás tendenciáját sikerült igazolni.

Ezzel szemben a nestin esetében, a microarray adatokhoz képest, a real-time PCR nem mutatott ki szignifikáns mértékű expresszió csökkenést. A Western blottal kapott eredményeink viszont teljes mértékben eltértek az array adataitól. A Col2A1 elenyésző mértékben volt kimutatható, ugyanakkor a SOX2 expressziója jelentősen meghaladta az Id2-ét. Ugyanakkor egyik vizsgált gén és genotípus esetében sem tapasztaltunk az adherens és a spheroidként növekvő sejtek között eltérést.

Mivel a már 2006-os kísérletek során a sejtvonalak tumorigenitásában a passzázsszám növekedésével csökkenést tapasztaltunk, megkíséreltük a sejtfelszíni SSEA-1 őssejtmarker alapján cell sorter felhasználásával dúsítani a feltételezett őssejtfrakciót. Ezek nem vezettek eredményre, mivel az így kiválasztott sejtpopuláció nagyon gyorsan eldifferenciálódva ismét csak a kiindulási SSEA-1 gyakoriságot mutatta. Ezért 2007-ben in vivo végeztük el a tumorigenításra irányuló szelekciót. Egér syngraft modellben az adherens DFS HDC<sup>+/+</sup> és DFS HDC<sup>-/-</sup> sejt tumorképző képességét vizsgálva, a létrejött tumorokból újra sejtvonalakat készítettünk, s ezeket újra syngraft modellbe oltva, az új tumorokból készített sejtvonalakkal még kétszer ismételtük meg a fenti eljárásort. Így végül közel 90 %-s tumorigenitást kaptunk, azaz sikerült a vélelmezett tumorőssejt populációt dúsítanunk. Ezek real-time PCR-rel a korábban már vizsgált őssejtmarkerek hasonló mértékű expresszióját mutatták. Így a továbbiakban már ezekkel terveztük folytatni a vizsgálatainkat, azonban hamarosan ismét tumorigenitás csökkenést tapasztaltunk, ezért 2008-ban ismételt in vivo eljárással megkíséreltük a korábban már bevált tumorőssejt populációdúsítást, de ez sajnálatos módon nem sikerült. A syngraftba oltott sejtek nem képeztek többé tumort az újra meg újra ismételt kísérleteink során. Tehát valószínűsíthető, hogy a kiindulási DFS <sup>+/+</sup> és DFS KO tumorokból heterogén sejtpopulációt tartalmazó vonalak jöttek létre, melyek a tenyésztés során vagy tovább mutálódva veszítették el tumorképző sajátosságukat, vagy belőlük egy olyan morfológiájukban és a vizsgált markerekben nem vagy nem nagyon eltérő szubpopuláció szelektálódott ki, amely vagy eleve vagy már nem rendelkezett ezzel tulajdonsággal. Így a fentebb leírt eredményeink is inkább a sejtek adhéziójával mintsem daganatképző képességével állhatnak összefüggésben. Illetve ez a fokozatos szubpopuláció dúsulás magyarázhatja az array, a real-time PCR és a Western blot eredményeink diszkrépanciáját is.

Annak igazolására, hogy a tumor spheroid- és az őssejtek embryoid body-képzése hasonló gének expressziójának megváltozását igénylő folyamatok, a Dr. Gócza Elen MBK, Gödöllő közreműködésével korábban egy másik pályázat kapcsán - Biotechnológia 2001 – előállított, Balb/c genetikai háttérű, vad típusú és HDC KO ES sejteket is felhasználtuk. Itt kiindulásként a HDC +/- ES és a belőlük létrehozott embryoid body-k expressziós mintázatát hasonlítottuk össze 44 000 génes Agilent platform használatával. Itt is négy biológiai és két technikai párhuzamossal dolgoztunk kétszín jelöléssel. Az eredmények bioinformatikai kiértékelése során, várakozásunkon felüli nagyszámú gén mutatott eltérő expressziót. Ezeknek az eredményeknek a kiértékelése során kiderült, hogy a rendszer génextpressziós mintázata igen nagymértékben eltér a DFS tumorsejtek esetében megfigyeltétől. Várakozásunktól eltérően az ismert Oct4 őssejtmarker expresszióváltozását nem sikerült detektálnunk, de a tumorsejtek esetében észlelt nestin sem került a bioinformatikai értékeléssel kiválasztott gének közé. Ugyanakkor az őssejt megújulásban érintett, de a DFS rendszerben nem talált, Nanog a várakozásnak megfelelően expresszió csökkenést mutatott. Az Id2 és a Sox2 expressziójának változási tendenciája ugyanakkor eltért: az Id2-é nőtt, a Sox2-é csökkent. Ezek után összehasonlításképpen elvégeztük néhány a tumor-tumor spheroid rendszerben már elemzett gén (SOX2, Id2 és nestin) RT PCR-rel történő vizsgálatát is. Ennek során az Id2 expresszió változásának tendenciája az ES-EB rendszerben megegyezett a tumor-spheroid rendszerével, de mértéke annak sokszorososa volt. A SOX2 expresszióváltozás eltérő tendenciájú volt itt is: a tumor-spheroid rendszerben nőtt, az ES-EB rendszerben csökkent az expresszió. Tehát itt a real-time PCR megerősítette az array eredményét. A változás mértéke, vagyis a csökkenés azonban az ES-EB összehasonlításban sokszorososa volt a tumor-tumor spheroid esetében detektált növekedésnek. A SOX2 expresszió EB-k esetén mért csökkenése összhangban van azzal a 2006-ban tett immuncitokémiai megfigyelésünkkel, miszerint a SOX2 expresszáló sejtek aránya csökkent a HDC KO EB-ben. Bár a nestin a real-time PCR-rel kimutatható, mivel mindkét rendszerben teljesen azonosan viselkedett, azaz egyik rendszerben sem változott, így érthető módon az array bioinformatikai kiértékelésében nem szerepelt.

Mivel az ES - EB rendszer expressziós adatainak kiértékelésekor számos extracelluláris mátrix komponens (Col5a, Col1a, Col18a1, FBLN2 stb.) expressziójának változását észleltük, és mert a spheroid, illetve EB képzés jelentős

mértékben függ a sejtadhézió mértékétől, ezért vizsgálatainkat két újabb irányba is kiterjesztettük. ECIS (Applied Biophysics) ill. X-celligence (Roche) rendszerben impedancia mérés segítségével elemeztük a DFS HDC +/+ és a DFS HDC -/- letapadó sejtek és spheroidok adhézióját. Mivel az adhézió során a KO sejtek fokozottabb adhéziós képességet mutattak ezért egy olyan, az extracelluláris mátrix képzésében és a tumorok angiogenezisében érintett, antiangiogentikus hatású gén expressziójának (fibulin5=FBLN5) vizsgálatára is kitértünk, amelyről egy másik (melanoma) rendszerben Intézetünkben már kimutattuk, hogy a HDC expresszió, illetve a hisztamin negatívan befolyásolja. Első megközelítésben a vad típusú DFS és a DFS HDC KO letapadó sejtekben vizsgáltuk a fibulin5 expressziót. Ennek során a DFS HDC KO sejtek kifejezettebb FBLN5 expresszióját mutattuk ki, mely a hisztamin receptor - H1R és H2R - antagonisták kezelésére fokozódott.

Összefoglalásként elmondható, hogy a projekt során elvégzett összehasonlító vizsgálatok során elemzett markerek a DFS tumorsejtek esetében is, mint már az ES sejtekben bizonyított inkább a sejtmeújulásban, mint a tumorképzésben játszhatnak szerepet. Ez összhangban áll az éppen a DFS sejteket érintő, a tumorigenitás elvesztésével, de a proliferációs képesség megőrzésével kapcsolatban tett megfigyelésünkkel. Valamint az is feltételezhető, hogy jelen esetünkben inkább a Wnt útvonal és a sejtadhézió közötti, már ismert kapcsolat, egy másik aspektusára és esetleg egy másik elemére (hisztamin és Fibulin5?) sikerült rátalálnunk, amelynek megerősítése azonban nagyobb léptékű további vizsgálatokat igényelne.