

**A mezenhimális őssejt-eredetű galektin-1 meghatározó
faktor a felnőtt szöveti őssejtek pro-angiogén funkciójában**

Kriston-Pál Éva

Ph.D. értekezés tézisei

*Témavezető: Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.
tudományos tanácsadó*

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet
Limfocita Jelátviteli Csoport

Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK, Szeged
2014

Bevezetés

A keringési rendszer fontos szerepet tölt be a tápanyagok és az oxigén szövetekhez, az anyagcseretermékek szövetektől való elszállításában, a távoli szervek hormonális kommunikációjának biztosításában, valamint a gyors immunválasz kialakításában. A szervezet növekedését kísérő hipoxiás állapot hatására számos pro-angiogén faktor termelődik, mely beindítja a meglévő erek bimbózását, amit az endotél sejtek (EC-k) tömör húrú kapcsolódása követ. A csupasz ereket alkotó EC-kből további faktorok szabadulnak fel, melyek a periendothelialis sejtek kapillárisok felé vándorlását, valamint heterotípusos kapcsolatok formálódásával az újonnan kialakult erek stabilizációját indítják be. Az angiogenezis folyamatának tanulmányozására többféle *in vitro* kísérleti rendszer létezik, például a pre-vaszkuláris struktúra teszt, melynek során EC-ket periendothelialis sejtekkel növesztik együtt, és a kialakuló sejtcsoportosulások kiterjedését analizálják pro- ill. anti-angiogén faktorok jelenlétében.

Posztnatálisan csak bizonyos életfolyamatokhoz kapcsolatosan figyelhető meg érképződés, míg patológiás esetben elsősorban a szilárd daganatok fejlődése során figyelhető meg az angiogenezis beindulása. A tumorsejtek önmagukban nem képesek a szervezetben túlélni és szaporodni, szükségük van arra, hogy egészséges sejteket a daganatszövet fejlődésének támogatására alakítsák át. A szilárd daganatokban növekedésük során hipoxiás területek alakulnak ki, ami indukálja a pro-angiogén faktorok termelődését. A tumor-eredetű faktorok kontrollálatlan kifejeződése miatt azonban a fiziológiástól eltérő működésű erek jönnek létre. A tumorszövetet ellátó erek mellett, a tumor sztróma más komponensei, mint például a tumor-asszociált fibroblasztok (TAF-ok), valamint a periendothelialis sejtek (periciták, vaszkuláris simaizom sejtek) elengedhetetlenek a daganat növekedése szempontjából. Eredetük kevésbé ismert, egyik lehetséges forrásuk a csontvelői mezenhimális őssejtek (MSC-k) lehetnek. Az MSC-k - más néven felnőtt szöveti őssejtek - olyan multipotens sejtek, melyek kis százalékban valamennyi szövetben megtalálhatók, fiziológiás feladatuk a szervek kötőszövetének megújítása. Daganatos megbetegedés esetén az MSC-k mobilizálódhatnak, és a tumorszövetben halmozódnak fel, ahol befolyásolják annak fejlődését. A feltételezés szerint hozzájárulnak a tumor immunprivilegiumának kialakításához, valamint az általuk termelt szolubilis pro-angiogén faktorok, valamint a heterotípusos sejt-sejt kapcsolatok kialakítása révén növelik a tumorszövet érdenzitását.

A mezenhimális őssejtek nagy mennyiségben termelik a galektin-1-et (Gal-1), melynek ligandjai β -galaktozidok tartalmú glikokonjugátumok. Gyulladáscsökkentő,

immunszuppresszív hatása miatt fiziológiásan az immunhomeosztázis fenntartásában tulajdonítanak neki kiemelt feladatot. Erre a szerepére utal, hogy elsősorban az immunprivilegizált területeken mutat fokozott expressziót. A Gal-1 számos szolid tumorban fokozottan fejeződik ki, ahol több ponton is támogatja a patológiás folyamatot: serkenti a tumorsejtek osztódását, migrációját, a tumort infiltráló T sejtek apoptózisát, és így hozzájárul immunprivilegizált környezet kialakításához és támogatja az angiogenezist. Az érképződés serkentése az EC-k proliferációjának és vándorlásának indukálásával és a sejtek életképességének fokozásával valósul meg.

A Gal-1 tehát számos módon hozzájárul a daganatok fejlődéséhez, kiváló célpontot szolgáltatva daganatellenes terápiáknak. A tumor-eredetű Gal-1 gátlásával stimulálni lehetne a szervezet immunológiai védekezését, valamint csökkenthető a szilárd daganatok érképződése, mely a metasztázis kialakulásának kockázatát is redukálja.

Célkitűzések

Annak vizsgálatához, hogy az MSC-eredetű Gal-1 milyen módon szabályozza a tumor növekedést, a következő kérdéseket kívánjuk megválaszolni:

- 1.) A mezenhimális őssejtek és endotél sejtek *in vitro* együtt tenyésztése során hogyan hatnak az endotél sejtek az MSC-k osztódására, és fordítva, valamint az MSC-k EC-re gyakorolt hatása Gal-1 függő módon valósul-e meg?
- 2.) Az *in vitro* tenyészetekben megjelenő pre-vaszkuláris struktúrák formálódásához milyen feltételek szükségesek: elegendő a szolubilis faktorok jelenléte, vagy nélkülözhetetlenek a közvetlen sejt-kapcsolatok? Továbbá, a pre-vaszkuláris struktúrák kialakításában van-e funkciója az MSC-eredetű Gal-1-nek?
- 3.) Szerepet játszik-e a mezenhimális őssejtek által termelt Gal-1 az MSC-k *in vivo* tumorfejlődést támogató funkciójában? Az MSC-eredetű Gal-1 immunszuppresszív vagy pro-angiogén hatása érvényesül-e a tumor növekedés *in vivo* támogatásában?

Alkalmazott módszerek

Az emlős sejtkultúrákat szén-dioxid termosztátban tenyésztettük. A pre-vaszkuláris struktúra teszt alkalmazása során endotél sejteket és MSC-eket növesztettünk együtt két napig, majd a kialakuló sejtcsoportosulások hosszát CellR Imaging szoftver segítségével mértük le. A szolubilis faktorok hatásának tanulmányozására a pre-vaszkuláris tesztet Transwell rendszerben ill. ko-kultúráról származó kondicionált médiumban végeztük el. A heterotípusos sejtkultúrák növekedését CFSE fluoreszcens festékkel jelölt sejteken követtük nyomon, melyeket áramlási citofluorimetriával és CellQuest program segítségével értékeltük ki.

Az MSC-k tumorfejlődésre gyakorolt hatását *in vivo* kétféle tumor modell rendszerben vizsgáltuk. Egyik esetben a karcinóma sejteket előzetesen összekevertük a vad típusú ill. a Gal-1 knockout MSC-vel majd a sejtkeveréket a kísérleti állat emlőszövetébe jutattuk, másik esetben tumoros egereket kezeltünk intravénásan MSC-vel. Az MSC-k immunológiai vonatkozásának kiderítéséhez XSCID egereket kezeltünk melanóma és MSC sejtkeverékkel. A tumornövekedést a szilárd daganat térfogatának kétnaponkénti meghatározásával követtük, az angiogenezis mértékét hisztokémiai metszeteken analizáltuk.

Eredmények

- **Az MSC-k pro-angiogén funkcióját *in vitro* pre-vaszkuláris modell tesztben tanulmányoztuk**
 - A ko-kultúrában tartott MSC és EC-k módosítják egymás osztódását és életképességét. Bár MSC^{vt}-vel való együtt tenyésztés az EC-k proliferációját nem befolyásolta, az MSC^{Gal-1^{-/-}} jelenléte azonban dóziszfüggően gátolta az endotél sejtek szaporodását. Ezzel szemben az EC-k kis mértékben, de szignifikánsan serkentették az MSC^{vt} ill. MSC^{Gal-1^{-/-}} növekedését. Az EC-k életképességének vizsgálata során megfigyeltük, hogy Gal-1 hiányos MSC jelenlétében szignifikánsan megnő az elpusztult sejtek mennyisége.
 - Az MSC-k Gal-1 termelése befolyásolja az EC-MSC ko-kultúrában kialakuló pre-vaszkuláris sejtcsoportosulások hosszát. A legtöbb struktúrát MSC^{vt} jelenlétében láttunk, míg az EC és MSC^{Gal-1^{-/-}} együtt növesztésekor kevesebb struktúra alakult ki. A Gal-1 extracelluláris szerepére utal, hogy Gal-1 gátlószer, a tioidigalaktózid

jelenlétében a vad típusú MSC és az EC szignifikánsan kevesebb pre-vaszkuláris struktúrát alakított ki, mint a kontroll csoportok.

- A pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásához közvetlen sejt-sejt kapcsolatra van szükség, amit kétféle megközelítéssel igazoltunk: 1) Transwell rendszerben fizikailag elválasztva növesztettük az EC és az MSC-eket, vagy 2) MSC-eredetű extracelluláris mátrixra szélesztettük az endotél sejteket, melyeket MSC-k által kondicionált médiumban tenyésztettünk. Egyik kísérleti elrendezésben sem alakultak ki pre-vaszkuláris struktúrák.

- **Tumoros egerek intravénás MSC kezelése során a mezenhimális őssejtek Gal-1 függő módon serkentik a daganatszövet növekedését**
 - A kísérleti egereket ortotopikusan injektáltuk emlőkarcinóma sejtekkel, majd tapintható tumor kialakulását követően az állatokat intravénásan kezeltük a különböző típusú MSC-ekkel. A Gal-1-et kifejező MSC-k szignifikánsan serkentették a daganat fejlődését a Gal-1 deficiens MSC-khez képest. Ez az eredmény egybecseng a ko-transzplantációs tumor modell esetén tapasztalattal, amikor az emlőkarcinóma sejtek és MSC-eket egy időben juttattuk az emlőszövetbe.

 - MSC^{vt} nem a tumor ellenes immunválasz gátlásával serkenti a tumor növekedést. Melanóma sejteket és MSC^{vt} ill. $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ -ket kevertünk össze és X-SCID immundeficiens egerekbe. A melanóma növekedési üteme nem különbözött az X-SCID és az egészséges egereket összehasonlítva, tehát az MSC-eredetű Gal-1 nem a tumor-ellenes immunfolyamatok gátlásával gyakorolt hatást a daganatfejlődésre.

 - Az MSC-eredetű Gal-1 szerepet játszik a daganatszövet vaszkularizációjában. Az emlőkarcinóma és MSC ko-transzplantált egerek daganatszövetét hisztokémiailag elemeztük. A csak 4T1-gyel egyedül, illetve $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ -vel ko-transzplantált állatokban fejlődő tumorok érdenzitása hasonló mértéket mutatott, ezzel szemben a vad típusú MSC^{vt} és emlőkarcinóma kombinációja esetén szignifikánsan erezettebb tumorszövet alakult ki.

Jelen kutatás alapján a következő új megállapításokat fogalmazhatjuk meg:

- **Adaptáltuk és továbbfejlesztettük az érképződés egyik *in vitro* modelljét, a pre-vaszkuláris modell rendszert, mely alkalmas az MSC szabályozó szerepének vizsgálatára az érképződés során. Ennek alkalmazásával a következő megállapításokat tettük:**
 - Az MSC^{Gal-1^{-/-}} jelenléte dóziszfüggően gátolta az endotél sejtek szaporodását
 - Az endotél sejtek kis mértékben, de szignifikánsan serkentették az MSC^{vt} ill. MSC^{Gal-1^{-/-}} növekedését
 - A Gal-1 hiányos MSC jelenlétében jelentősen megnő az elpusztult sejtek mennyisége
 - A pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásához közvetlen sejt-sejt kapcsolatra van szükség
 - Az MSC-eredetű Gal-1 támogatja a ko-kultúrában kialakuló pre-vaszkuláris sejtcsoportosulások formálódását the length of the pre-vascular structures greatly depend on the expression of Gal-1 in MSCs and on the ratio of EC to MSC in co-cultures.
 -
- **Az MSC Gal-1 termeléstől függő szabályozó szerepét tumoros állat modellben igazoltuk és bizonyítottuk, hogy:**
 - Az MSC-tumor sejt kotranszplantációhoz hasonlóan (Isd Szebeni GJ Ph.D. tézis) az intravénásan oltott MSC-k Gal-1 függő módon serkentik a tapintható tumorok növekedését emlő karcinómás egerekben.
 - Az MSC-eredetű Gal-1, immunszoppresszív tulajdonsága ellenére, nem a tumorspecifikus immunválasz gátlásával, hanem a daganatszövet érképződésének fokozásával támogatja a tumor növekedést.

Összefoglalás

Az *in vitro* eredmények azt sugallják, hogy az MSC-eredetű Gal-1 alapvető szerepet játszik az angiogenezis támogatásában, mely hatásra *in vivo* tumor modell rendszerekben nyertünk igazolást.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Monostori Évának, hogy elmélyítette a szakma iránti érdeklődésemet, valamint a gondos témavezetéséért és hasznos tanácsaiért, melyekkel segítette e munka elkészítését. Köszönöm végtelen türelmét és a sok bátorítását.

Köszönöm a Limfocita Jelátviteli Csoport valamennyi tagjának a munkám során nyújtott segítséget: Dr. Fajka-Boja Robertának a mindennapi segítőkész hozzáállását, gyakorlatias tanácsait és a dolgozatom alapos átolvasását, Dr. Szebeni Gábor Jánosnak az *in vivo* végzett munkák betanítását, Dr. Czibula Ágnesnek és Szabó Enikőnek az MSC-k differenciáltatását, Makra Ildikónak a segítőkészségét, Hornung Ákosnak a statisztikai számításokhoz adott tanácsait, és Gercsó Andrásnének a kiváló munkavégzését. Hálás vagyok csoportunk volt tagjainak: Végh Leának, Dr Blaskó Andreának és Novák Juliannának a remek munkahelyi légkörért.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Uher Ferencnek, aki biztosította számomra a munkám során felhasznált MSC-ket sok gyakorlati tanáccsal egyetemben. Köszönet illeti Prof. Dr. Robert Kiss-t (Free University of Brussels) a kísérleteimben használt B16F10 egér melanóma és Dr. Vizler Csabát a 4T1 és H5V sejtvonalakért.

Köszönöm Dr. Mátés Lajosnak, hogy rendelkezésemre bocsátotta a Sleeping Beauty rendszert és Dr. Katona Róbertnek, hogy lehetőséget adott az X-SCID egereken elvégzett a kísérletekre, valamint Marton Annamáriának, aki megtanított egereket intravénásan oltani. Köszönöm Kotogány Editnek az áramlási citofluorimetriában, Dr. Ferhan Ayaydinnak és Kószó Zsuzsannának a konfokális és fluoreszcens mikroszkópiában nyújtott segítségét, Veres Erikának, valamint az SZBK Állatház munkatársainak a mindennapi remek együttműködő légkört.

Hálásan köszönöm a lehetőséget Prof. Dr. Fekete Évának és Dr. Bódi Nikolettnek, hogy az SZTE Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén végezhattük a paraffinba ágyazott minták előkészítését, és metszését.

Végezetül hálás vagyok az Úr Jézus Krisztusnak, hogy adott képességet és lehetőséget arra, hogy elvégezzem az egyetemet, és azért, hogy a kutatásban maradhattam. Nagyon köszönöm Anyukámnak, hogy lehetővé tette, hogy Szegedre jöhessek biológiát tanulni, köszönöm belém vetett töretlen hitét és a türelmet, amit az elmúlt időszakban tanúsított irántam; hálás vagyok Tesómért, Dávidért, akivel a dolgozatírással kapcsolatban hasonló

kihívásokkal nézhettem szembe, és felváltva bátoríthattuk egymást. Sokat köszönhetek elsősorban Sipos Márknak, Kiss Brigittának, Kada Szilviának és Janovics Zsuzsannának, hogy remek barátokként végig mellettem voltak és mindenben támogattak a doktori tanulmányaim során.

A munkához nyújtott pályázati támogatások: NKTH-OTKA CK 78188, OTKA PD 75938, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Szebeni GJ*, **Kriston-Pál É***, Blaszó P, Katona RL, Novák J, Szabó E, Czibula Á, Fajka-Boja R, Hegyi B, Uher F, Krenács L, Joó G, Monostori É. *Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion*. PLoS One. 2012; 7(7):e41372. IF(2012): 3.73

*megosztott első szerzők

Novák J, **Kriston-Pál É**, Czibula Á, Deák M, Kovács L, Monostori É, Fajka-Boja R. *GMI controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis*. Molecular Immunology 2014; 57(2):302-9. IF(2012): 2.64

A dolgozat témájához lazán kapcsolódó közlemények

Hegedüs Z, Wéber E, **Kriston-Pál É**, Makra I, Czibula Á, Monostori É, Martinek TA. *Foldameric α/β -peptide analogs of the β -sheet-forming antiangiogenic anginex: structure and bioactivity*. Journal of American Chemical Society 2013; 135(44):16578-84. IF(2012): 10.67

Hegedüs Z, Wéber E, Végh L, Váczi B, Tubak V, **Kriston-Pál É**, Kele Z, Martinek TA. *Two-stage interaction of the tumor nursing galectin-1 with the antiangiogenic peptide anginex*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2014; DOI 10.1007/s10973-014-4031-9 IF(2012): 1.9

Konferencia előadások

1. Kriston-Pál Éva, Szebeni Gábor János, Novák Julianna, Czibula Ágnes, Szabó Enikő, Fajka-Boja Roberta, Uher Ferenc, Krenács László, Monostori Éva. ***A mesenchymalis őssejtek által termelt galektin-1 az érképződés serkentésével befolyásolja a tumorfejlődést.*** Magyar Immunológiai Társaság 41. Vándorgyűlése, Debrecen, 2012.10.17-19.
2. Kriston-Pál Éva
A galektin-1 fehérje szerepe a kapilláris-szerű struktúrák kialakulásában mezenhimális őssejt és endotélsejt ko-kultúrában. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2012.05.17-18.
3. Kriston-Pál Éva
Csontvelői eredetű mezenhimális őssejtek (MSC) és az MSC eredetű galektin-1 hatása fiziológias és patológias érképződésre. Sófi József Ösztöndíj konferencia, Szeged, 2011.

Konferencia poszterek

1. Éva Kriston-Pál*, Gábor János Szebeni*, Julianna Novák, Roberta Fajka-Boja, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Ferenc Uher, Éva Monostori. ***Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stem cell-mediated tumor promotion.*** Stem cells in cancer and regenerative medicine, Heidelberg, Germany, 2012.08.29.
2. Kriston-Pál Éva, Fajka-Boja Roberta, Czibula Ágnes, Szebeni Gábor János, Uher Ferenc, Monostori Éva. ***Mezenhimális őssejt-eredetű galektin-1 hatása az in vitro érdifferenciációra.*** Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Szeged, 2011.10.12-14.
3. Éva Kriston-Pál, Roberta Fajka-Boja, Julianna Novák, Gábor János Szebeni, Ferenc Uher, Éva Monostori. ***Galectin-1 is required to the formation of capillary-like structures in mesenchymal stem cell and endothelial cell co-culture.*** Impulse Szimpózium, Visegrád, 2011.09.3-6.

NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy a Ph.D. jelölt **Kriston-Pál Éva** jelentős mértékben hozzájárult az alábbi cikk létrehozásához és téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Szebeni GJ*, **Kriston-Pál É***, Blazsó P, Katona RL, Novák J, Szabó E, Czibula Á, Fajka-Boja R, Hegyi B, Uher F, Krenács L, Joó G, Monostori É. *Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion.* PLoS One. 2012; 7(7):e41372. IF(2012): 3.73

Szeged, 2014. szeptember 2.

Prof. Dr. Monostori Éva
tudományos tanácsadó
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény társszerzője, igazolom, hogy Kriston-Pál Éva a cikk létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult és kijelentem, hogy a téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésében nem használjuk fel.

Novák J, **Kriston-Pál É**, Czibula Á, Deák M, Kovács L, Monostori É, Fajka-Boja R. *GMI controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis*. Molecular Immunology 2014; 57(2):302-9. IF(2012): 2.64

Szeged, 2014. 09. 02.

Dr. Fajka-Boja Roberta
Tudományos munkatárs
MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet