



**Gasztrin receptor expresszió új szinterei:
Cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) expressziójának és
funkciójának vizsgálata gastrointestinalis myofibroblastokon és
human melanoma sejteken**

dual Ph.D. Tézis

Dr. Varga Ákos János

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Németh István PhD

Doctoral College of Liverpool, University of Liverpool

Témavezető: Prof. Dr. Andrea Varro, DSc; Prof. Dr. Graham J. Dockray FMedSci, FRCP, FRS

Bőgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szegedi Tudományegyetem
Department of Translational Medicine, University of Liverpool

Szeged

2019

Tartalom

1	Bevezetés	1
2	Célkitűzés	2
3	Anyagok és módszerek.....	3
3.1	<i>Sejtenyésztés</i>	<i>3</i>
3.2	<i>Intracelluláris kalcium</i>	<i>3</i>
3.3	<i>Immuncitokémia.....</i>	<i>3</i>
3.4	<i>Betegbevonás és adatbázis.....</i>	<i>3</i>
3.5	<i>Gasztrin radioimmunoassay</i>	<i>3</i>
3.6	<i>H. pylori kimutatás</i>	<i>3</i>
3.7	<i>qPCR.....</i>	<i>3</i>
3.8	<i>EdU proliferációs assay.....</i>	<i>4</i>
3.9	<i>CeCo proliferációs assay.....</i>	<i>4</i>
3.10	<i>Áramlási citometria és sejtszeparálás</i>	<i>4</i>
3.11	<i>Spheroidok.....</i>	<i>4</i>
3.12	<i>Organoid tenyészetek.....</i>	<i>4</i>
3.13	<i>Kondicionált médium proteomikai elemzése</i>	<i>4</i>
3.14	<i>Western blottok.....</i>	<i>4</i>
3.15	<i>ELISA.....</i>	<i>5</i>
3.16	<i>Sejtmigrációs és inváziós kemotaxis assay-k.....</i>	<i>5</i>
3.17	<i>Melanoma sejtek transzfekciója MMP-2 siRNS-sel</i>	<i>5</i>
3.18	<i>Immunhisztokémia.....</i>	<i>5</i>
3.19	<i>Statisztika</i>	<i>5</i>
4	Eredmények	6
4.1	<i>Myofibroblastok.....</i>	<i>6</i>
4.1.1	<i>A GI traktus szisztematikus vizsgálata konzisztens CCK2 receptor expressziót igazolt a myofibroblastok egy szubpopulációjában</i>	<i>6</i>
4.1.2	<i>CAM-ek fokozott CCK2R expressziót mutattak a szomszédos ATM-ekhez képest előrehaladott nyirokcsomó metasztázissal rendelkező betegeknél.....</i>	<i>6</i>
4.1.3	<i>Gasztrin hatására megemelkedik az intracelluláris kalciumszint a myofibroblastok egy részében</i>	<i>6</i>
4.1.4	<i>CCK2R expresszió a sejtciklushoz kapcsolt.....</i>	<i>7</i>

4.1.5	Gasztrin fokozza az EdU jelölt és jelöletlen gyomor myofibroblastok migrációját és invázióját	7
4.2	Melanoma sejtek.....	8
4.2.1	Humán melanoma sejtek egy részén megtalálható a CCK2 receptor	8
4.2.2	Szérum gasztrin koncentráció befolyásolja a melanoma progresszióját.....	8
4.2.3	CCK2R expressziójának vizsgálata human melanoma sejtvonalakon.....	9
4.2.4	Gasztrin fokozza a melanoma sejtek migrációját és invázióját	9
4.2.5	Dermális fibroblastok fokozzák a melanoma spheroidok növekedését.....	9
4.2.6	Gasztrin fokozza a melanoma sejtek invázióját dermális fibroblastok és myofibroblastok jelenlétében.....	10
4.2.7	Gasztrinnal kezelt melanoma sejtenyészetek szekretóm és ehhez kapcsolt jelútszerének vizsgálata MMP-2 fokozott szekrécióját, és TIMP-3 inhibícióját igazolta	10
4.2.8	MMP-2 expressziót gátló siRNS-sel transzfektált melanoma sejtekkel végzett kemotaxis vizsgálatokban a gasztrin migrációra és invázióra gyakorolt stimuláló hatása elmarad ..	11
4.2.9	MMP-2 és TIMP-3 kimutatása melanomás és basaliomás betegek szérummintáiból	11
5	Megbeszélés.....	12
5.1	<i>CCK2R</i> expresszió myofibroblastokon	12
5.2	<i>CCK2R</i> expresszió melanoma sejteken	14
6	Összefoglalás és új eredmények	17
7	Köszönetnyilvánítás	18
8	Közlemények jegyzéke.....	19

Rövidítések:

ASI (Acid secretion inhibitor), ATM (Adjacent tissue myofibroblast), BCC (Basal cell cancer), CAF (Cancer-associated fibroblasts), CAM (Cancer-associated myofibroblasts), CCK2R/CCKB (Cholecystokinin-2 / -B / gasztrin receptor), CCK-8 / CeCo (Cell counting Kit-8), CNS (Central nervous system), CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12), DAB (3,3-diaminobenzidine), ECL (Enterochromaffin-like cell), ECM (Extracellular matrix), EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine), EGF (Epidermal growth factor), ELISA (Enzyme-linked immunoassay), ERK (Extracellular signal-regulated kinase), FGF (Fibroblast growth factor), FITC (Fluorescein isothiocyanate), FM (Full medium), GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), GI (Gastrointestinal tract), GIST (Gastrointestinal stromal tumour), GLP (Glucagon-like peptide), GPCR (G-protein-coupled receptors), *H. pylori* / *Hp* (Helicobacter pylori), H2RB / H2RA (Histamine type 2 receptor antagonist), HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor), hG17 (Human heptadecapeptide gasztrin), HGF (Hepatocyte growth factor), IGF (Insulin-like growth factor), JNK (c-JUN N-terminal kinase), KGF (Keratinocyte growth factor), MAPK (Mitogen-activate protein kinase), MM (Malignant melanoma), MMP (Matrix metalloprotease), MSC (Mesenchymal stem/stromal cell), NTM (Normal tissue myofibroblast), OD (Optical densitometry), PDGF (Platelet derived growth factor), PPI (Proton pump inhibitor), qPCR (Quantitative polymerase chain reaction), SF (Serum free), SIDLS (Stable Isotope Dynamic Labelling of Secretomes), SMA (Smooth muscle actin), TAM (Tumour-associated macrophage), TGF (Transforming growth factor), TIMP (Tissue inhibitors of matrix metalloproteases).

1 Bevezetés

A gasztrin szerepe egyre inkább elismert különböző eredetű (nyelőcső, gyomor, pancreas vastagbél) gastrointestinalis tumorok kialakulásában (Ferrand et al. 2006). Az a koncepció, hogy a daganatok nem gyógyuló krónikus sebek, jól ismert (Dvorak 1986, Desmouliere et al. 2004). Ebben az összefüggésben kiemelendő, hogy a gasztrin receptorok (CCK2R) expressziója a gyomor sebgyógyulásakor is megfigyelhető. Schmassmann és Reubi (2000) in situ hibridizációt alkalmazva fokozott CCK2R expressziót mutatott ki patkány gyomor cryo-ulcerációját követően (Schmassmann et al., 2000). Ashurts és mtsai. (2008) később bebizonyították, hogy az említett egérgyomor cryo-ulcerációját követően tapasztalt CCK2R kifejeződése α -simaizom aktinnal azonos lokalizációban fordult elő, mely utóbbi a myofibroblastokra jellemző biomarker (Ashurst et al., 2008). Ezek az adatok azonban állatmodellekből származnak, és a konkrét élettani mechanizmusok, melyek de novo receptor expresszióhoz, ill. sejttoborzáshoz vezetnek, beleértve ezek klinikai jelentőségét továbbra sem ismertek.

Az adatok alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a gasztrin receptor (CCK2R) aktivált myofibroblastokon is megtalálható, azonban ennek jelentősége kevésbé ismert és ezidáig humán myofibroblastok CCK2 expressziójának célzott vizsgálata nem történt. Mivel a myofibroblastok kellően mozgékonyak, az adatok alapján az hipotézis is felállítható, hogy a gasztrin ezeknek a sejteknek a migrációjára is hatással van, CCK2 receptorokon keresztül.

A malignusan transzformálódott melanocytákból kiinduló melanoma malignum (Paek et al. 2008) magas metasztatikus potenciállal rendelkező, az egyik legveszélyesebb bőrdaganat típus (Ingraffea 2013). A Human Protein Atlas (HPA), Cancer Genome Atlas, Genotype-Tissue Expression (GTEx) project és FANTOM5 project adatai felvetették melanomában CCK2R jelenlétének lehetőségét. Ezeknek az eredményeknek a birtokában felmerül a kérdés, hogy van-e bármilyen kapcsolat hypergastrinaemia és a melanoma progressziója között. Korábbi tanulmányok alapján a gasztrin pleiotrop hatással rendelkezik a melanoma sejtekre, de a releváns jelátviteli utak és receptorok kevésbé ismertek és a rendelkezésre álló adatok is ellentmondásosak (Mathieu et al. 2005). A kérdés azért is fontos, mert azoknál a betegeknél, akiknél hypergastrinaemia alakul ki bármilyen oknál fogva (hosszú távú PPI terápia következmények, *H. pylori* infekció vagy atrophias corpus gastritis miatt) felmerül a koincidentális melanoma disszemináció fokozott rizikójának lehetősége normális szérumszinttel rendelkező betegekhez képest (Heidelbaugh et al. 2012, Smolka et al. 2012, Watari et al. 2014, Dacha et al. 2015, Hastrup et al. 2018).

2 Célkitűzés

A kutatás célja CCK2R expresszió új színtereinek azonosítása és ezzel együtt a receptor funkciójának ill. jelentőségének vizsgálata. Amint azt számos szerző korábban kiemelte, annak ellenére, hogy széles körű ismeretekkel rendelkezünk a gasztrintról és a CCK2 receptorokról, a humán élettanban és kórélettanban betöltött multiplex szerepeik újabb és újabb aspektusai kerülnek folyamatosan felismerésre. A stromális myofibroblastok a tumor mikroölyezetének és szöveti regenerációnak fontos meghatározói. Az a nemrég kialakult koncepció, hogy a daganatok krónikus, nem-gyógyuló sebeknek is tekinthetők egy újabb kapcsolódási pont ebben. Több irodalmi utalás felveti annak a lehetőségét, hogy a tápcsatornában lévő myofibroblastokon megtalálható a gasztrin receptor, azonban ennek szerepe messze nem egyértelmű. Első lépésként emiatt a teljes gastrointestinalis rendszert megvizsgáltuk, a CCK2 receptort expresszáló myofibroblastokra funkcionalitást célzó kísérletekkel együtt.

Hosszú távú savszekréció-gátló kezelés gyakori komplikációja a megnövekedett gasztrin plazmakoncentráció. Nyílt forráskódú fehérje adatbázisok adatai arra utalnak, hogy melanoma sejteken megtalálható a gasztrin receptor. Figyelembe véve annak a lehetőségét, hogy a dermális stroma sejtek szintén expresszálhatják a CCK2R-t, úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a gasztrin melanomára gyakorolt hatását in vitro és in vivo körülmények között felhasználva prospektíván gyűjtött különböző stádiumú melanomás betegek szérum és szövetsmintáit is.

Összefoglalt célok:

1. A GI traktus különböző részeiből származó myofibroblastok CCK2R expressziójának vizsgálata. A receptor funkciójának valamint a gasztrin stromális sejtek számára és motilitására gyakorolt hatásának jellemzése.
2. CCK2R expresszió kiértékelése melanomás betegek biopsziás mintáiban. Ezeknél a betegeknél a szérum gasztrin-koncentráció meghatározása, valamint ennek a pTNM stádiummal, a *H. pylori* fertőzéssel és a savszekréció-gátlókkal való esetleges korrelációjának vizsgálata.
3. A gasztrin stromális és melanoma sejtek proliferációjára, adhézíójára, migrációjára és inváziójára gyakorolt hatásának vizsgálata.
4. Gasztrin kezelt melanoma sejtek szekretómjának elemzése és releváns jelutak azonosítása.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Sejttenyésztés

Az alábbi kísérleteket humán G361 és Skmel-2 melanoma sejtvonalakon, dermális fibroblastokon, humán mesenchymalis stromasejteken, humán primer gyomor CAM-eken vagy vastagbél, hasnyálmirigy ill. nyelőcső tumor eredetű ATM-eken, egészséges gyomor és nyelőcső NTM-eken valamint krónikus pancreatitisből származó myofibroblastokon végeztük (Czepan et al. 2012, Holmberg et al. 2012, Kumar et al. 2014).

3.2 Intracelluláris kalcium

Szubkonfluens sejteket Ca^{2+} fluorofór Fluo-4 AM-vel telítettünk a korábban részletezettek szerint (Homolya et al. 1993, Kao 1994). Myofibroblastokat és melanoma sejteket hG17 (10 nmol/L)-el stimuláltunk. Ionomicin szolgált (1 μ mol/L) pozitív kontrollként.

3.3 Immuncitokémia

Myofibroblast és a melanoma kultúrák CCK2R festését poliklonális IgG ellenanyaggal végeztük, melyet FITC-konjugált nyúl elleni szekunder antitesttel vagy peroxidáz (DAB) reakcióval vizualizáltunk a fentiekben leírtak szerint (Wroblewski et al., 2003, Kumar et al., 2014).

3.4 Betegbevonás és adatbázis

A Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati Klinikájára melanoma malignum vagy basalioma iránydiagnózissal 2017. február és május között beutalt betegektől vérmintát vettünk. Némely esetben immunhisztokémiai vizsgálatra paraffin blokk és formalin fixált betegmintákat kértünk ki a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika valamint a Patológiai Intézet szövet-archívumából.

3.5 Gasztrin radioimmunoassay

A szérum gasztrin szintet radioimmunoassay módszerrel határoztuk meg, a korábban leírtak szerint (Dodd et al., 2019).

3.6 *H. pylori* kimutatás

A *H. pylori* antitestek kimutatása a betegek szérummintáiból kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel történt (Biohit Health Care, UK).

3.7 qPCR

Myofibroblastokat (0,25 - 1,5 x 10⁶) és melanoma sejteket (5x10⁵ / 5 cm-es Petri-csészék) komplettált médiumban inkubáltuk 72 órán át. A sejteket az RNS extrakció előtt lizáltuk, majd TaqMan primer / próba szekvenciák alkalmazásával vizsgáltuk humán IGF-1, IGF-2 és CCK2R-re.

3.8 *EdU proliferációs assay*

Myofibroblastokat és a melanoma sejteket hG17-el (0,1-1,0-10,0 nmol/L) kezeltünk 24 órán át. A proliferáló sejteket Click-iTTM EdU imaging készlettel (Invitrogen, Paisley, Egyesült Királyság) azonosítottuk a korábban leírtak szerint (Varga et al., 2017).

3.9 *CeCo proliferációs assay*

Cell Counting Kit-8 assay-t (Dojindo Laboratories, München, Németország) használtuk a melanoma sejtek proliferációs aktivitásának kimutatására.

3.10 *Áramlási citometria és sejtszeparálás*

Myofibroblastokat és melanoma sejteket (T75 edénybe 10⁶ sejtet oltva) egy éjszakán át 10 nM G17-el vagy FM-el kezeltünk. A sejteket FACS Canto II áramlási citométerrel szeparáltuk a korábban leírtak szerint (Varga et al., 2017)

3.11 *Sferoidok*

Skmel-2 sejtekből álló sferoidot (3000 per csepp) helyeztünk myofibroblastokat tartalmazó (10 000 lyukanként 24 lyukú lemezeken), vagy azoktól mentes kollagén ágyba és hat napig inkubáltuk. Sferoidok növekedésének mértékét az alapterület nagyságának egészszeres változásában mértük.

3.12 *Organoid tenyészetek*

Az organoid tenyészeteket Skmel-2 melanoma sejtek (1x10⁶) myofibroblastokat tartalmazó (0,5 x 10⁶), vagy anélküli Matrigel (Corning, NY, USA) és I-es típusú kollagén (Millipore, MA, USA) 1: 1 arányú keverékének tetejére rétegezve készítettük. A tumorsejtek inváziójának mértékét a melanoma-Matrigel kontakt határhoz viszonyítottuk.

3.13 *Kondicionált médium proteomikai elemzése*

Az Skmel-2 és a G361 melanoma szekretómban lévő lehetséges gasztrin targeteket Stable Isotope Dynamic Labelling of Secretomes (SIDLS) módszerrel azonosítottuk (Kristensen et al. 2012, Hammond et al. 2018). A szűrt adatok Panther v.10-be kerültek felöltésre a szignifikánsan dúsult (p < 0,05) fehérjeosztályok, molekuláris funkciók és a biológiai folyamatok meghatározására.

3.14 *Western blotok*

A médium mintákat StrataClean resins (Agilent Technologies Ltd) felhasználásával koncentráltuk, és Western blot elemzés céljából az előzőekben ismertetett módon feldolgoztuk (Hemers et al. 2005) MMP-2, TIMP-3, TIMP-1, TIMP-2, és prosaposin kimutatása céljából (R&D Systems).

3.15 ELISA

Médium, valamint melanomás és basaliomás betegektől származó szérum minták elemzése TIMP-3 és MMP-2 kimutatására antitesttel előre bevont kolorimetrikus ELISA lemezekon történt.

3.16 Sejtmigrációs és inváziós kemotaxis assay-k

Sejtmigrációs és inváziós kemotaxis assay-khez BD inserteket vagy BD BioCoat™ Matrigel™ kamrákat (SLS, Nottingham, UK) használtunk a korábban leírtak szerint (Varro et al., 2004). Gasztrin kezelést 24 órán át 10 nmol/L koncentrációban alkalmaztunk.

3.17 Melanoma sejtek transzfecciója MMP-2 siRNS-sel

Melanoma sejtek tranziens transzfecciója Amaxa™ Cell line Nucleofector™ V készlettel történt T-19-es programot alkalmazva a magas transzfecció hatékonyság érdekében (Amaxa, Köln, Németország) a korábban leírtak szerint (Kumar et al., 2014).

3.18 Immunhisztokémia

Az MM és BCC betegektől származó mintákat a gyomor- és hólyag tumoros betegektől származó kontrollokkal együtt Leica BOND Max Autostainerrel automatizált módon, standardizált körülmények között festettük CCK2R, MMP-2, TIMP-3 és Melan-A-ra.

3.19 Statisztika

Az eredményeket átlag ± standard szórásként (SEM) tüntettük fel, minden egyéb esetben külön jeleztük. Paraméteres tesztek (t-próba, Fisher exact teszt, Pearson's chi-négyzet próba és ANOVA), valamint ahol a normál disztribúció sérült Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztek alkalmaztunk $p < 0,05$ szignifikanciával Systat Software Inc. v. 12.0 (London, Egyesült Királyság) és IBM SPSS Statistics V26.0 (New York, USA) programokat alkalmazva.

4 Eredmények

4.1 Myofibroblastok

4.1.1 *A GI traktus szisztematikus vizsgálata konzisztens CCK2 receptor expressziót igazolt a myofibroblastok egy szubpopulációjában*

Több myofibroblast populációban vizsgáltuk a CCK2R expresszióját, melyek a nyelőcső, gyomor, omentum, vastagbél vagy hasnyálmirigy területéről származó ép szövetből, tumorból vagy tumorról szomszédos szövetből kerültek izolálásra. Vizsgáltunk ezenkívül olyan myofibroblast sejtvonalakat is, melyek egyéb ritkább gastrointestinalis betegségből pl.: krónikus pancreatitis, vipoma, GIST vagy anaemia perniciosa) származtak. Minden esetben a sejtek egy alpopulációja volt CCK2R pozitív, 1 és 6% között. A legmagasabb expresszió vastagbélben ($5,96 \pm 1,41\%$), nyelőcsőben ($5,63 \pm 0,81\%$) és gyomorban ($3,87 \pm 0,49\%$) volt megfigyelhető. Anaemia perniciosa, krónikus pancreatitis, Vipoma és GIST esetén volt a legalacsonyabb az expresszió. A gyomornál és a nyelőcsőnél szignifikáns különbség volt ($5,96\%$ vs. $0,39\%$ és $5,63\%$ vs. $1,75\%$; $p < 0,05$) CAM-ek és az ATM-ek vagy NTM-ek között.

4.1.2 *CAM-ek fokozott CCK2R expressziót mutattak a szomszédos ATM-ekhez képest előrehaladott nyirokcsomó metasztázissal rendelkező betegeknél*

13 gyomor adenocarcinómából származó CAM-ek és ATM-ekből álló microarray adatbázis (Balabanova et al. 2014) vizsgálatakor azoknál a betegeknél, ahol magasabb volt a nyirokcsomó áttétek száma (pN2-4) a CCK2R expresszió 6-ból 5 CAM esetén magasabb volt a társított ATM-ekhez képest, szemben az alacsonyabb nyirokcsomó érintettségű csoporttal (pN0-1), ahol 7-ből 6 CAM esetén alacsonyabb CCK2R expressziót volt megfigyelhető a megfelelő ATM párhoz képest ($P < 0.05$, Fisher exact test). Immunitokémiai eredményeket felhasználva a betegeket ATM és megfelelő CAM párokba rendezve szintén szignifikánsan magasabb CCK2R expresszió volt megfigyelhető a tumor asszociált myofibroblast (CAM) csoportban azoknál a betegeknél, akik multiplex nyirokcsomó metasztázissal rendelkeztek (SCAM4/ATM4, pN2; S-CAM1/ATM1, pN2) szemben az alacsony nyirokcsomó érintettségű betegekhöz képest (S-CAM2/ATM2, pN0; S-CAM3/ATM3, N1), ahol az ellenkezője volt igaz.

4.1.3 *Gasztrin hatására megemelkedik az intracelluláris kalciumszint a myofibroblastok egy részében*

Annak meghatározására, hogy képes-e a gasztrin a myofibroblastokból egy funkcionális válasz kiváltására mértük a citoplazma kalcium szintjének változását gasztrin stimulációt követően. hG17 (10 nmol/L) adása az intracelluláris kalcium szint gyors növekedését eredményezte gyomor eredetű CAM-ek egy részében ($5,3 \pm 1,4\%$).

4.1.4 CCK2R expresszió a sejtciklushoz kapcsolt

Szinkronizálást követően megvizsgáltuk myofibroblastoknál egy DNS-be épülő proliferációs marker (EdU) és a CCK2 receptor viszonyát. A sejtek többsége (a kísérlet körülményeihez mérten) mind EdU, mind CCK2R negatív volt ($79,5 \pm 4,0\%$). Számos EdU pozitív myofibroblast nem expresszálta a gasztrin receptort ($15,9 \pm 4,0\%$). A CCK2R pozitív sejtek a teljes populáció 5% -át alkották. Érdekes módon a CCK2R-t expresszáló sejtek több, mint 80%-a EdU-val is jelölődött. Ezek az eredmények felvetették egy sejtciklus dependens receptor expresszió lehetőségét, melynek vizsgálatára kinetikai kísérleteket végeztünk. Az FM-ben inkubált sejtek szignifikánsan magasabb arányban jelölődtek EdU-val, mint az SF médiumban lévő 4 órás inkubációt követően ($28,7 \pm 0,3$ vs $5,2 \pm 0,6\%$, EdU-t inkorporáló sejtek, $p < 0,001$). Míg az EdU jelölt sejtek aránya fokozatosan növekedett FM-ben történő inkubáció során, addig a CCK2R expresszió szintje relatív konstans maradt a sejtek 3-10%-át érintve. Utóbbi legmagasabb a korai időpontokban volt, majd 4 órás inkubációt követően fokozatosan csökkent. Hasonlóan a sejteknek az a szubpopulációja, mely CCK2R pozitív volt, de nem inkorporálta a proliferációs markert (<1%) viszonylag állandó maradt. Ezek az adatok egy tranziens S fázishoz kötött gasztrin receptor expresszióra utalnak, melyet valószínűleg a receptor inaktivációja követ.

4.1.5 Gasztrin fokozza az EdU jelölt és jelöletlen gyomor myofibroblastok migrációját és invázióját

Gasztrin (10 nmol/L hG17) szignifikánsan fokozta a sejtek migrációját és invázióját ($p < 0.05$; ANOVA), mely hatást a CCK2R antagonistá (100 nmol/L L740093) megfelelően gátolt transwell Boyden kemotaxis vizsgálatokban.

Gasztrin stimulálta továbbá az EdU jelölt sejtek migrációját is, amit az L740093 gátolt ($p < 0.05$; ANOVA). A reszponder sejteknek ugyanakkor, csak nagyjából 40%-a volt EdU pozitív, ami arra utal, hogy a CCK2R-t expresszáló sejtek képesek a többi myofibroblastot parakrin módon is aktiválni. A gasztrin stimulációt követően mind az EdU-jelölt és jelöletlen myofibroblastok száma növekedett, és ez az alkalmazott hG17 koncentrációjával korrelált. Ennek ellenére, a proliferáló sejteknek az EdU jelöletlen myofibroblastokhoz viszonyított százalékos aránya ($\Delta\Sigma\text{-EdU}\Delta\text{hG17} = -7.57\%$) magasabb gasztrin koncentrációk mellett fokozatos csökkenést mutatott. Ez inkább a direkt út jelentőségét hangsúlyozza, különösen magasabb gasztrin koncentrációk esetén.

Az IGF receptor tirozin-kináz-inhibitor AG1024 gátolta a hG17-stimulált sejtmigrációt és kisebb mértékben az inváziót. hG17 jelenlétében továbbá az IGF-2 transzkript mennyisége $2,1 \pm 0,1$ -szer magasabb volt a kontrollokhöz képest ($p < 0,05$); IGF-1 gyakorlatilag kimutathatatlan maradt. GLP-2 stimulált myofibroblastokat használtunk pozitív kontrollként az IGF kimutatása során (Shawe-Taylor et al. 2017).

4.2 Melanoma sejtek

4.2.1 Humán melanoma sejtek egy részén megtalálható a CCK2 receptor

Első lépésben, melanomás betegek bőrmintáinak immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük. Ugyanabból a betegből egészséges bőrterületről származó minták szolgáltak kontrollként. A stratum basáleban elhelyezkedő melanocyták egy kis részénél igazolódott CCK2R (2-3%) expresszió. Néhány esetben az agresszív tumorsejtek dedifferenciálódás során elvesztették Melan-A pozitivitáskát, de továbbra is expresszálták a gasztrin receptort. Kettős jelölés megerősítette, hogy a mind a hét vizsgált betegben megtalálható volt melanoma sejteken a CCK2 receptor. Alacsonyabb stádiumú melanomás mintáknál magasabb denzitometriai értékeket kaptunk előrehaladottabb stádiumú melanomákhoz képest ($0,18 \pm 0,03$ vs. $0,11 \pm 0,02$ OD unit <pT2a, n = 5 és> pT2b, n = 2; t-teszt p = 0,166). Hasonló reláció igazolódott ugyanabból a betegből származó egészséges melanocyták és melanoma sejtek összehasonlítása során (pT3b; n = 2) ($0,19 \pm 0,02$ vs. $0,11 \pm 0,02$ OD unit melanocytákban és a melanoma sejtekben; t-teszt p = 0,139).

Viszonyítási pontként megvizsgáltuk a CCK2R expressziót basaliomában is (n=3). Utóbbi esetben nem volt kimutatható CCK2R jelenlét, szemben a melanomával. Kettős jelölés bár számos Melan-A pozitív melanocytát igazolt a basaliomás sejtfészkek egy részében, a CCK2R expressziója nem változott. Tumor típustól függetlenül a stromában több mesenchymalis eredetű sejt (fibroblast, myofibroblast) mutatott gasztrin receptor expressziót.

Quantitatívabb összehasonlítás érdekében, négy kategóriát különítettünk el a receptort kifejező sejtek aránya alapján (0%, 1-25% (1+), 26-50% (2+) vagy 51-100% (3+)). Receptor pozitív sejtek szignifikánsan nagyobb arányban fordultak elő a melanomában, mint a kontroll basaliomás csoportban (χ^2 -teszt, p < 0.05). CCK2 expresszió melanomás betegeknél 18-ból 15 esetben volt kimutatható míg basaliománál 10-ből 2 esetben volt jelen. Az eredményeket denzitometriai vizsgálat is megerősítette (Mann-Whitney U-teszt, p < 0,05).

4.2.2 Szérum gasztrin koncentráció befolyásolja a melanoma progresszióját

A betegeket I. és II. stádiumú csoportokra osztottuk: pT<2a és pT>2b kategóriák alapján. Ez a felosztás az American Joint Committee on Cancer 8. kiadásában lévő beosztást követi, mely a melanomás betegeket prognosztikai szempontból csoportosítja; az I stádium alacsony kockázatú primer melanomás betegeket tartalmazta (pT1a, pT1b and pT2a), míg a II. stádiumba a recidíva szempontjából magasabb rizikójú betegek kerültek (T2b, T3a, T3b, T4a, and T4b) regionális nyirokcsomó vagy távoli metasztázis nélkül (Gershenwald et al. 2017). Az alacsony szérum gasztrinnal rendelkező betegek aránya szignifikánsan magasabb volt az I. stádiumú csoportban ($\Delta\% = 43,1$ a teljes kohorthoz képest). Ez a különbség a II. stádium esetén csökkent, szinte azonos arányban tartalmazva alacsony és magas gasztrin szinttel rendelkező betegeket ($\Delta\%=6,8$). Az adatok alapján a II. stádiumú MM betegeknél szignifikánsan magasabb volt a szérum gasztrin-koncentráció (OR 8.5, p < 0.0005; Fisher exact test p < 0.0003), az I. stádiumban lévő betegekhöz képest (40 ± 6.8 pM vs. 24 ± 4.4 pM; II stádium vs. I stádium).

4.2.3 CCK2R expressziójának vizsgálata human melanoma sejtvonalakon

Korábbi eredményekkel ellentétben (Mathieu et al. 2005) két, erre a célra kiválasztott melanómás sejtvonalon (Skmel-2; G361) is sikerült immuncitokémiai módszerekkel CCK2R jelenlétét igazolni. Az immunfluoreszcens vizsgálat a receptor pontszerű citoplazmikus festődését mutatta. Peroxidáz reakció a sejtek $21 \pm 5\%$ -ban igazolt CCK2R expressziót. Ezt követően qPCR-ral is igazoltuk mindkét sejtvonalnál CCK2R transzkriptek jelenlétét. Cycle threshold (Ct) értékek Skmel-2 és G361 esetén 35.5 ± 0.3 és 33.8 ± 0.4 voltak. Δ Ct értékek GAPDH-t referencia pontként használva Skmel-2 és G361 esetén 15.9 ± 0.2 és 15.2 ± 0.2 .

4.2.4 Gasztrin fokozza a melanoma sejtek migrációját és invázióját

A gasztrin szignifikánsan fokozta, a melanoma sejtek migrációját (mind Skmel-2, mind G361 esetén) Boyden-kamrákban végzett transwell-kemotaxis vizsgálatokban (One-Way ANOVA, $p < 0.01$). Ezt a hatást, az L740093 CCK2 receptor antagonistá (100 nmol/L, korábban igazolt effektív koncentrációban) gátolta (One-Way ANOVA, $p < 0.01$). Gasztrin hasonlóan stimulálta az Skmel-2 és G261 melanoma sejtek invázióját is, mely hatást az L740093 szintén csökkentett (One-Way ANOVA, $p < 0.01$).

Tekintettel, a korábban kapott eredményekre, mely szerint a gasztrin jelentősen fokozza a melanoma sejtek invázióját, egy másik fajta inváziós modell alkalmazása mellett döntöttünk, melyben I. típusú kollagén és Matrigel keverékének tetejére rétegeztünk Skmel-2 melanoma sejteket. Kollagénben diszpergált gyomor CAM-ek fokozták a melanoma sejtek mélyebb struktúrák felé történő invázióját. Amikor az organoidokat gasztrinnal kezeltük (10 nM hG17), az invázió mélysége jelentősen megnőtt (One-Way ANOVA; SF vs. Myo: $p < 0.001$ and Myo vs. Myo + hG17: $p = 0.008$). Ez a jelenség nem volt tapasztalható SF médiumban tárolt kezeletlen organoidoknál.

4.2.5 Dermális fibroblastok fokozzák a melanoma sferoidok növekedését

A gyomor CAM-ekkel kapott eredményekhez hasonlóan, melanoma sferoidok inkubációja dermális stroma sejteket tartalmazó Matrigel-kollagén ágyban, a tumor sferoidok átlag alapterületének 1.3 ± 0.1 -szeres növekedését eredményezte 6 napos periódus alatt a kontrollokhoz viszonyítva (Kruskal-Wallis test; fib. vs. no fib.: $p=0.01$). Az inkubáció ideje alatt alkalmazott gasztrin nem volt hatással a sferoidok méretére sem fibroblastokkal ($\Delta 6$ daysF.Ch: 1.3 ± 0.1 vs. 1.3 ± 0.2 ; kezelt vs. kontroll) sem azok nélkül ($\Delta 6$ daysF.Ch: 1.1 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1). Dermális fibroblastok melanoma növekedésre gyakorolt hatása gasztrintól független volt (Kruskal-Wallis test; fibs. + hG17 vs. fibs. + no G17 $p = 1.0$).

Sferoidoknál külön vizsgáltuk az egyes sejteknek sferoid centrumtól mért maximális migrációs távolságát is. Bár, a tumoraggregátum méretére nem volt hatással a gasztrin, CCK2 receptor pozitív melanoma sejtek migrációja akkor volt a legjelentősebb, amikor a dermális fibroblastokkal körülvett sferoidokat gasztrinnal kezeltük. Ez a fajta gasztrin hatására bekövetkezett ugrás a migráló sejtek számában fibroblastok hiányában elmaradt (One-Way ANOVA, gasztrin vs. gasztrin + fibs: $p < 0.001$), hasonlóan önmagukban a fibroblastok sem voltak hatással a tumorsejtek migrációjára gasztrin nélkül (One-Way ANOVA, fibs vs. gasztrin + fibs.: $p < 0.001$).

4.2.6 *Gasztrin fokozza a melanoma sejtek invázióját dermális fibroblastok és myofibroblastok jelenlétében.*

Melanoma organoidoknál, az epidermális-dermális junctiót jelképező tumor-stroma határ intakt maradt a kontroll mintákban mesterségesen kialakított bazális membrán hiányában is, a 2 hetes vizsgálati időszak alatt. Melanoma sejteket I típusú kollagén mátrixban diszpergált fibroblastok tetejére rétegezve, tumorsejtek egy csoportja nyúlványok ill. nodulusok formájában a mélyebb rétegek irányába penetrált (One-Way ANOVA, fibs. vs. acelluláris kollagén mátrix: $p < 0.001$). Gasztrin tovább fokozta ezeknél az organoidoknál a tumorinvázió mértékét (One-Way ANOVA, fibroblastok + G17 vs. acelluláris kollagén mátrix: $p < 0.001$; fibroblastok vs. fibroblastok + G17, $p = 0.002$). Ez, a stimuláló hatás azonban stromasejt mentes kollagén mátrix esetén elmaradt.

4.2.7 *Gasztrinnal kezelt melanoma sejtenyészetek szekretóm és ehhez kapcsolt jelútrendszerének vizsgálata MMP-2 fokozott szekrécióját, és TIMP-3 inhibícióját igazolta*

Melanoma sejtek szekretómját vizsgáltuk gasztrin kezelést követően olyan módszerekkel, melyek célja a gasztrin kezelés hatására fokozott vagy csökkentett mennyiségű klasszikus módon szekretált fehérjék azonosítása volt. Fehérjéket legalább egy egyedi triptikus peptid alapján azonosítottuk. Az összes találat körülbelül 10% -ánál (a Skmel-2 és a G361 esetében 1266 és 1507 találat közül 134 és 187-nél) inkorporálódott lizin. H és L izotópok aránya Skmel-2-nél 0.0012-2.193, G361-nél 0.0011-1.785 tartományban mozgott. Jelölt fehérjék kb. 50%-a volt klasszikus módon szekretált (Skmel-2 esetén 65 G361-nél 93), melyet megfelelő fehérjeszortírozó szignálszekvenciákat alkalmazva SignalP D-score > 0.45 alapján azonosítottunk (Petersen et al. 2011). Az inkorporált H (kezelt minták) és L (kontrollok) lizin aránya Skmel-2 melanoma sejtek fokozott MMP-2 termelését igazolta. Ezzel ellentétben, G361 melanoma sejteknél MMP-2 expresszióra a gasztrin nem volt hatással, viszont csökkentette a metalloproteáz inhibitorok (TIMP-3 (0.125), kisebb mértékben TIMP-1,2 (0.87; 0.7)) szekrécióját. Mivel az MMP-2 és TIMP-ek funkciójukat tekintve komplementerként viselkednek ECM remodelláció szempontjából, így ez egy lehetséges mechanizmus, mely a CCK2R aktivált melanoma sejtek fokozott invazivitásának hátterében áll.

4.2.8 MMP-2 expressziót gátló siRNS-sel transzfektált melanoma sejtekkel végzett kemotaxis vizsgálatokban a gasztrin migrációra és invázióra gyakorolt stimuláló hatása elmarad

A proteomikai eredmények funkcionális jelentőségének igazolásához, Skmel-2 melanoma sejteknél siRNS-ekkel MMP-2 knock down-t végeztünk. Ezt követően Boyden kamrák és Matrigel-lel bevont biomembránokra felvitt melanoma sejtréteget gasztrinnal kezeltünk 24 órán át. A gasztrin sejtmigrációra gyakorolt stimuláló hatása MMP-2 hiányában jelentősen elmaradt (kontroll kezelt vs. MMP-2 knock down: One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Ennek ellenére még jelentősen csökkent MMP-2 termelés mellett is képes volt a gasztrin fokozni a sejtmigrációt, a kezeletlen kontrollokhoz képest (kontroll vs. knock down; One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Ezt a hatást valószínűleg számos parakrin jelátviteli kaszkád is erősíti, hasonlóan az epiteliális sejteknél, vagy a gyomor myofibroblastoknál leírtakhoz (nevezetesen IGF rendszer, IL-8 vagy prosztoglandin) (Noble et al. 2003, Hemers et al. 2005, Varga et al. 2017). Melanoma sejtek invázióját, még erősebben gátolta a csökkent mennyiségű MMP-2, de a gasztrin kontrollokhoz viszonyított stimuláló hatása itt is megmaradt (gasztrin kezelt vs. MMP-2 knock down; One-Way ANOVA; $p < 0.05$, MMP-2 knock down kontroll vs. kezelt; One-Way ANOVA; $p < 0.05$)

G361 melanoma sejteknél a szekretóm elemzés csökkent, TIMP-3 szekréciót igazolt. Itt, ennek a metalloproteáz inhibitornak a helyettesítése sikeresen csökkentette a migráló sejtek számát a kontrollokhoz képest (TIMP-3 + G17 vs. G17; One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Ez a gátló hatás még kifejezettebb, amikor a melanoma sejteknek egy kollagén mátrixon kellett keresztül vándorolniuk az inváziót mutató sejtek számát szinte alapszintre csökkentve (TIMP-3 + G17 vs. G17; One-Way ANOVA; $p < 0.05$).

4.2.9 MMP-2 és TIMP-3 kimutatása melanomás és basaliomás betegek szérummintáiból

MMP-2 szérum koncentrációja (ng/ml) nem mutatott különbséget basaliomás és melanomás beteg között (227 ± 8 vs. 240 ± 17 ; MM vs. BCC). Nem igazolódtott korreláció továbbá a tumorvastagsággal, vagy a betegség progressziójával sem (230 ± 11 vs. 226 ± 12 ; I. vs. II Stádium). MMP-2 koncentrációja 200-250 ng / ml között volt, amely a kontroll, egészséges egyéneknél leírt tartomány. Hasonlóan nem volt különbség a két betegcsoport között TIMP-3 szérum koncentrációjának (ng/ml) tekintetében sem (14 ± 1 vs. 17 ± 4 ; MM vs. BCC). Előrehaladott melanoma stádium nem befolyásolta a TIMP-3 szintjét (15 ± 2 vs. 14 ± 2 ; I. vs. II Stádium).

MMP-2 és TIMP-3 immunhisztokémiai vizsgálatát is elvégeztük melanomás és basaliomás betegek véletlenszerűen kiválasztott szövettani mintáin. Mindkét bőrtumor típusnál elsősorban a tumor stromára lokalizálódó MMP-2 jelenléte igazolódtott. Némely szerző TIMP-3 expresszió csökkenéséről számol be melanoma progressziójával, mi sem MM sem BCC esetén immunhisztokémiai módszerekkel TIMP-3-at kimutatni nem tudtunk (Das et al. 2016).

5 Megbeszélés

5.1 CCK2R expresszió myofibroblastokon

CCK2 (gasztrin) receptort 40 évvel ezelőtt írták le először az agyból izolálva (Saito et al. 1980). Megtalálható a tápcsatornában ECL, parietális és simaizomsejteken (Dockray 2004). Sebgyógyulást modellező állatkísérletekben de novo CCK2R expresszió igazolódott cryo-ulcerált gyomor mucosában és submucosában. Ezeket a sejteket később myofibroblastként azonosították vimentin és simaizom α -aktin ko-expressziója alapján (Schmassmann et al. 2000, Ashurst et al. 2008). A GI traktus szisztematikus vizsgálata a myofibroblastok 1-6%-ánál igazolt CCK2R expressziót, mely a sejtek proliferációs aktivitásával mutatott összefüggést. A tumor stromából származó myofibroblastok (CAM) nagyobb arányban fejezték ki a receptort, mint a tumor közvetlen környezetéből (ATM) vagy egészséges szövetből származó sejtek (NTM) (Holmberg et al. 2012). EdU jelölés egy sejtciklustól függő, konkrétan S fázishoz kapcsolt tranziens receptor expressziót igazolt.

CCK2 receptorok a G-proteinhez kapcsolt, hét transzmembrán doménnel rendelkező receptorcsaládba (GPCR) tartoznak (Dufresne et al. 2006). Gasztrin stimulációt követően myofibroblastokban tapasztalt emelkedett kalciumszint, egy funkcionális receptor jelenlétére utal. GPCR agonistákról jól ismert, hogy mitogén hatásúak különböző növekedési faktorok és citokinek (pl. IGF, EGF stb.) felszabadítása révén (Varro et al. 2002). A gasztrin trófikus, valamint a sejt migrációra és invázióra (parakrin módon és direkt CCK2R aktiváción keresztül) gyakorolt hatása jól ismert jelenség a gyomor glanduláris epiteliájában (Noble et al. 2003, Kumar et al. 2015).

Kevés adat áll azonban rendelkezésre a CCK2 receptorok myofibroblastokon betöltött funkciójáról. Bár, a gasztrin nem fokozta jelentősen a proliferáló sejtek számát, megnövelte viszont a (mitotikus orsóval és fragmentált sejt-maggal rendelkező) osztódó sejtek arányát, mely a sejt ciklusra gyakorolt gyorsító hatására utal hasonlóan a kemokin receptoroknál (CXCR3 és GPR19) tapasztalhatóhoz (Romagnani et al. 2001, Kastner et al. 2012). Gasztrin stimulálta CCK2 receptorokon keresztül a gyomor eredetű myofibroblastok invázióját és migrációját kemotaxis vizsgálatokban. Érdekes módon fokozta a receptort nem expresszáló myofibroblastok migrációját is, valamint növelte az IGF-2 transzkript mennyiségét ezekben a sejtekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a gasztrin nem csak direkt hatással rendelkezik a myofibroblastokra, de képes parakrin ható egyéb faktorok (pl. IGF-2 és egyéb) felszabadítására, melyek pontosabb karakterizálása a későbbiekben szükséges. Összességében úgy tűnik, hogy a myofibroblastok által kifejezett CCK2 receptorok elsősorban a szöveti organizációban és remodellációban játszanak szerepet komplex epiteliális-mesenchymalis kölcsönhatások révén.

Jól ismert, hogy a myofibroblastok parakrin ható növekedési faktorok (HGF, KGF és CXCL12) felszabadításával - melyeknek receptorai az epiteliális sejteken találhatóak - hozzájárulnak a szöveti regenerációhoz és ezáltal az epitel réteg helyreállításához (Powell et al. 1999, Smith et al. 2005). Ezzel ellentétben, myofibroblast aktivációt epiteliális eredetű TGF- β révén szintén leírták, ahol a sebgyógyulás során megfigyelt megváltozott kontraktilitással és mátrix átépítéssel összefüggésbe hozott fokozott α SMA és MMP expresszió igazolódott (Powell et al.

1999, Pender et al. 2004). Egy másik terület, ahol az epithelialis-mesenchymalis kölcsönhatások fontos szerepet játszanak, akkor került a figyelem központjába, amikor a tumor mikrokörnyezet fogalmát bevezették és a daganatot többé nem malignusan transzformálódott sejthalmaként definiálták, hanem olyan korlátlan replikációs kapacitással rendelkező lézióként, mely befolyásolja és megváltoztatja a mikrokörnyezetét az apoptózis elkerülése és az önfenntartás megvalósítása érdekében (Hanahan et al. 2000). Ilyen irányú kutatások eredményei azt mutatják, hogy a myofibroblast aktiváció és toborzás fontos szerepet játszik a daganatok progressziójában. Az, hogy ezek a CAM-ek transzdifferenciált fibroblastokból, IGF I-II / EGF / PDGF által indukált proliferációból vagy keringő mesenchymalis őssejtekből származnak-e továbbra is vita tárgyát képezi (Elenbaas et al. 2001, Bhowmick et al. 2004, Brittan et al. 2004).

A tápcsatornában lévő CCK2 receptorok szerepe az epithelialis-mesenchymalis interakciókban még nem teljesen tisztázott, azonban a korábban részletezetteknek megfelelően, valószínűleg szerepet játszanak a myofibroblastok pozíciójának meghatározásában, amint azok a sejtciklus S-fázisából kilépnek, ezáltal hozzájárulva a szöveti remodelációhoz mind a regeneratív folyamatok, mind a tumoros mikrokörnyezet kialakítása során. Összeségében ez egy új megközelítést jelent, hogy miként képes a gasztrin a gyomor mucosa architektúráját élettani és pathofiziológiai körülmények között befolyásolni.

5.2 CCK2R expresszió melanoma sejteken

Egyre inkább előtérbe kerül a CCK2 szöveti regenerációban és sebgyógyulásban betöltött szerepe. Ahogyan azt korábban is részleteztük (5.1 szekcióban) most már a myofibroblastokat is hozzá sorolhatjuk a gasztrin által szabályozott epiteliális restitúció ismert célpontjai és kulcsszereplői közé (Varga et al. 2017). Intenzív kutatás folyik a CCK2 receptorok tumorokban és praecancerosus állapotokban betöltött szerepével kapcsolatban. Ezeknek a legnagyobb része gastrointestinalis daganatokra fókuszál, ahol a gasztrin receptor leginkább a tumor mikro környezetének meghatározásában játszik szerepet (Hanahan et al. 2011, Quail et al. 2013). A Human Protein Atlas-ból származó adatok felvetették melanoma sejteken CCK2 receptorok expressziójának lehetőségét. Figyelembe véve a gyomor eredetű és dermális myofibroblastokkal kapott eredményeket, ennek a lehetőségnek a további vizsgálatát tűztük ki célul.

Melanomás minták immunfestése heterogén, de mindazonáltal konzisztens CCK2R expressziót mutatott. Ennek a tanulmánynak egy limitáló tényezője volt, hogy a melanomás mintákon CCK2 receptor alternatív splice variánsait nem vizsgáltuk, melyet a későbbiekben érdemes megtenni (Hellmich et al. 2000, Körner et al. 2010). Ennek ellenére dermális myofibroblastokon, fibroblastokon, melanoma sejteken és melanocytákon (itt a legkisebb mértékben) megtalálható volt a CCK2 receptor. Ez utóbbi felveti annak a lehetőségét is, hogy a központi idegrendszeren kívül van egy másik neurális eredetű sejtpopuláció is, amely kifejezi a gasztrin receptort.

Amikor melanomás betegek éhomi szérum gasztrin koncentrációját hasonlítottuk össze a tumor vastagságával, egyértelmű tendencia mutatkozott magasabb gasztrin szintek és előrehaladott melanoma stádium között. *H. pylori* infekció (amely a gyomorrák egy ismert rizikófaktora) és savszekréció gátlók hosszú távú szedése igazolódott a vizsgált kohortban észlelt közepes fokú hypergastrinaemia hátterében. A fent említett okok miatt krónikus hypergastrinaemiában szenvedő betegek százalékos aránya megegyezett az irodalomban közölt értékekkel (Krashias et al. 2013, Helgadottir et al. 2014). Ezek az adatok felhívják a figyelmet arra, hogy a savszekréció gátlók indokolatlan szedése valamint a tünetmentes *H. pylori* hordozók melanoma progresszió szempontjából egy fokozott rizikócsoporthoz képviselnek. Primer melanomás sejtvonalakat (Skmel-2 és G361) használtunk annak vizsgálatára, hogy a gasztrin miként befolyásolja a melanoma viselkedését.

In vitro vizsgálatok egy funkcionális CCK2R expressziót igazoltak. A gasztrin tumor progresszióra gyakorolt hatása az elmúlt évtizedek gasztrinnal kapcsolatos kutatásainak középpontjába került. CCK2R expressziót számos malignus folyamatban leírtak (pl. pancreas adenoc., medulláris pajzsmirigy tu., astrocytoma, etc.) (Goetze et al. 2000, Koh et al. 2004, Roy et al. 2016), ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésre bőrtumorokkal kapcsolatban. A gasztrin tumor progresszióra gyakorolt hatása elsősorban az apoptózis, adhézió és proliferáció fokozásában nyilvánul meg Ras / Raf / MEK / ERK, JNK és a p38-MAPK jelátviteli utak aktivációján keresztül (Dehez et al. 2001, Dufresne et al. 2006).

Szisztémás disszemináció a melanoma vertikális növekedési fázisának, ezáltal a betegség progressziójának egy kulcsfontosságú lépése, melynek során a tumorsejtek lymphovascularis struktúrákba történő intravasatioja figyelhető meg. CCK2R aktiváció β -cateninek internalizálódását eredményezte tumormentes állatmodellekben lehetővé téve az epiteliális sejtek leválását (Bierkamp et al. 2002). Az integrinek szerepét (nevezetesen az $\alpha\beta 3$ vitronektin receptor $\beta 3$ integrin alegységének) részvételét szintén leírták melanomák vertikális növekedési fázisában (Sturm et al. 2002), mely felveti annak a lehetőségét, hogy a gasztrin az adhézións molekulák expresszióját közvetett módon is befolyásolni képes.

Noha a rendelkezésre álló adatok azt mutatják, hogy a gasztrin a gyomor nyálkahártyájának közvetlen növekedési faktora, egyre több bizonyíték utal arra, hogy parakrin ható citokinek felszabadításával receptor hiányában is képes a sejtproliferáció fokozására (Dockray et al. 2001, Varro et al. 2002). Melanoma sejtek nem reagáltak gasztrin ingerlésre sem monokultúrákban, sem spheroidot képező tumor aggregátumok formájában, melyeket ECM-et imitáló kollagén rétegbe helyeztünk. Ezek alapján valószínűtlennek tűnik, hogy a gasztrin közvetlenül befolyásolná a melanoma növekedését.

Stroma sejtekkel (dermális myofibroblast és MSC-k) ko-kultúrákat képezve rapid tumor expanzió volt észlelhető. Ez a megfigyelés a tumor milieu fontosságára és az epiteliális-mesenchymalis struktúrák közötti kommunikáció jelnetőségére hívja fel a figyelmet. Tumor asszociált fibroblastokat, myofibroblastokat és makrofágokat (CAF, CAM és TAM) a tumorigén környezet fenntartásának elengedhetetlen szereplőiként azonosítottak a közelmúltban (Joyce et al. 2009, Biswas et al. 2010). CAM-ek és nyirokcsomó érintettség közötti kapcsolatot szintén leírtak gyomor adenocarcinómában. A megnövekedett tumor tömeg ezekben az esetekben a stroma parakrin aktiváló hatására utal, többek között FGF, HB-EGF, TGF- β és IGFII felszabadításán keresztül, bár a mediátorok és az érintett jelutak még messze nem teljesen ismertek.

Másrészt viszont a gasztrin egyértelmű stimuláló hatást gyakorolt a melanoma sejtek migrációjára és inváziójára kemotaxis vizsgálatokban, Boyden-kamrákat és in vitro organoidokat alkalmazva; mely utóbbi a melanoma kutatásban egy gyakran használt modell (Hill et al. 2015). Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy a gasztrin melanoma sejtek invázióját és migrációját közvetlenül és közvetett módon a tumor és a stroma sejtek által expresszált CCK2 receptorokon keresztül is képes stimulálni, mely folyamatban számos parakrin mediátor is szerepet játszik.

Gasztrin által okozott gyors ECM-degradációért felelős fehérjék azonosítása érdekében, mely a melanoma sejtek fokozott metasztizáló képességét eredményezi, kondicionált médium proteomikai elemzést végeztünk melanoma szekretóm meghatározása céljából. Gasztrin releváns targetek a mátrix metalloproteáz 2 (MMP-2) fokozott és szöveti inhibitorának (TIMP-3) csökkent termelését igazolták. Bioinformatikai algoritmusok (PANTHER) segítségével végzett jelútrendszer vizsgálatok adhézións azonosítottak gasztrin stimulációt követően klasszikus módon szekretált fehérjék fő biológiai funkciójaként, mely eredményt adhézións assay-kkel validáltunk. MMP-k ECM remodelációban betöltött kulcsszerepét, mely a tumorsejtek intravasatiojához és tumor expanzióhoz elengedhetetlen számos tanulmány vizsgálta (Hojilla et al. 2008, Hua et al. 2011).

MMP-2 (mely a basalis membrán lebontásáért felelős zselatinázok közé tartozik) fokozott expresszióját több agresszív melanomás sejtvonalnál megfigyelték korábban (Hofmann et al. 1999, Hofmann et al. 2000). Egyes szerzők összefüggést találtak az MMP-k és tumor specifikus

túlélés között, míg mások korrelációt igazoltak nyirokcsomó metasztázissal, ami az MMP-k potenciális prognosztikai funkcióját veti fel (Vaisanen et al. 2011, Candrea et al. 2014). A mi munkacsoportunk nem talált összefüggést szérumban MMP-2 koncentráció és a melanoma progressziója között, ugyanakkor immunfestéssel jelentős mennyiségű aktív MMP-2 igazolódott a melanomás betegek szövettani mintáiban szinte kivétel nélkül. Bár, nem javasoljuk a szérumban MMP-2 alkalmazását biomarkerként, a helyi expressziós mintázat kétségkívül hasznos információt szolgáltat a betegség prognózisáról és a melanoma agresszivitásáról. TIMP-3 inhibícióját eredményező epigenetikai szabályozás vagy posttranszlációs módosítás számos malignus folyamatban, ideértve a pigmentált bőrelváltozásokat ismert jelenség, azonban TIMP-3 szöveti szintű változásait mi a fenti beteganyag mintáiban kimutatni nem tudtuk (Hu et al. 2006, Martin del Campo et al. 2015, Das et al. 2016).

MMP-2 expressziójának siRNA-sal való blokkolása és a TIMP-3 szubsztitúciója csökkentette a melanoma sejtek invázióját és migrációját. Összességében a proteomikai és funkcionális adatok arra utalnak, hogy gasztrin a proteáz / inhibitor tengelybe beavatkozva fokozza az ECM degradációját elősegítve ezzel a tumorsejtek disszeminációját és a melanoma progresszióját.

Végezetül tehát, a melanoma malignum is hozzáadható azon tumorok csoportjához, melyek expresszálják a CCK2 receptort. Gasztrin ismert funkcióinak listája kibővíthető a melanoma progresszióját és metasztázisát fokozó hatással, melyet proteázok és növekedési faktorok direkt és stroma sejtekből történő indirekt felszabadítása révén eredményez. Bármilyen eredetű hypergastrinaemiával rendelkező betegek melanoma progresszió szempontjából emiatt magas rizikójú csoportnak számítanak.

6 Összefoglalás és új eredmények

A kutatás célja a gastrointestinalis myofibroblastokon és human melanoma sejteken található CCK2 receptorok szerepének vizsgálata volt. A disszertáció főbb megállapításai a következők: a) CCK2 receptor a myofibroblastok 1-6%-ánál expresszálódik; b) tumor asszociált myofibroblastok nagyobb arányban fejezik ki a receptort; c) agonista hatására megemelkedett intracelluláris kalcium szint egy funkcionális receptort igazol, mely tranziens módon a sejtciklus S fázisában van jelen a sejtfelszínen; d) CCK2R a myofibroblastoknál elsősorban a gasztrin által szabályozott sejtmigrációban és invázióban játszik szerepet, és kevésbé a sejtproliferációban; e) humán melanomás szövetminták immunfestése a melanoma sejtek és kisebb mértékben a melanocyták CCK2R expresszióját igazolta; f) emelkedett szérumszintű gasztrin koncentráció és előrehaladott melanoma stádium között szoros korreláció igazolódott; g) primer melanoma tenyészetek (Skmel-2, G361), dermális fibroblastok és TGF- β transzformált myofibroblastok szintén expresszálják a CCK2 receptort; h) gasztrin nincs hatással a melanoma sejtek proliferációjára, de fokozza a migrációt és sejtinvasziót *in vitro*; i) stromális eredetű sejtek (gyomor CAM, MSC, dermális fibroblast) gasztrintól függetlenül fokozzák a tumor növekedését melanoma spheroid modellben; j) gasztrin fokozza a melanoma sejtek invázióját stroma sejtek jelenlétében melanoma organoidokban; k) gasztrin stimulált melanoma szekretóm proteomikai vizsgálata MMP-2 fokozott, TIMP-3 csökkent termelését igazolta; l) MMP-2 inhibíció és TIMP-3 szupplementáció csökkentette a melanoma sejtek migrációját és invázióját *in vitro*; m) MMP-2 és TIMP-3 szérumszintjének változásai nem mutattak összefüggést a betegség progressziójával, azonban az aktív MMP-2 kimutatható volt az összes melanomás mintában.

7 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni őszinte köszönetemet Dr. Varro Andrea Professor Asszonynak, valamint, Dr. Graham J. Dockray és Dr. Kemény Lajos Professor Uraknak folyamatos támogatásukért, motivációjukért és iránymutatásukért az egész kutatási projekt során. Rendkívüli szerencsém volt, hogy az élettan, gasztroenterológia és bőrgyógyászat nemzetközileg elismert kiváló szaktekintélyeivel együtt dolgozhattam közvetlenül tőlük megtanulva a tudományos gondolkodás, érvelést és problémamegoldás folyamatát.

Külön köszönet Dr. Dinesh Kumarnak, aki segített megismerkedni az új laborkörnyezettel, és akitől számos új kutatási módszert, technikai megközelítést tanultam. Köszönettel tartozom Dr. Németh Istvánnak a szövettani minták biztosításáért és Dr. Buknicz Tündének a szérumminták gyűjtésének megszervezésében nyújtott segítségéért. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Steven Dodd-nak a qPCR és a gyomor RIA adatok biztosításáért, valamint a Green Block-ban dolgozó összes kollégámnak a támogató munkakörnyezetért.

Végül szeretnék köszönetet mondani az egész családomnak az összes áldozatért, mellyel ennek a munkának a megszületését lehetővé tették, különösen édes anyámnak a folyamatos bátorításáért, páromnak egy szerető környezet biztosításáért, valamint édesapámnak, akire mindig felnéztem, és aki a fő oka volt, amiért a sebészetet választottam hivatásnak.

8 Közlemények jegyzéke

A tézis alapjául szolgáló közlemények:

Varga A, Kumar JD, Simpson AWM, Dodd S, Hegyi P, Dockray GJ, Varro A. Cell cycle dependent expression of the CCK2 receptor by gastrointestinal myofibroblasts: putative role in determining cell migration. *Physiol Rep.* 2017 Oct;5(19). pii: e13394.

Doi: 10.14814/phy2.13394; SJR **IF 0.948**

Shawe-Taylor M, Kumar JD, Holden W, Dodd S, **Varga A**, Giger O, Varro A, Dockray GJ. Glucagon-like peptide-2 acts on colon cancer myofibroblasts to stimulate proliferation, migration and invasion of both myofibroblasts and cancer cells via the IGF pathway. *Peptides.* 2017 May; 91:49-57.

Doi:10.1016/j.peptides.2017.03.008; **IF 2.851**

A tézis tárgyához kapcsolódó egyéb közlemények:

Garalla HM, Lertkowitz N, Tiszlavicz L, Reisz Z, Holmberg C, Beynon R, Simpson D, **Varga A**, Kumar JD, Dodd S, Pritchard DM, Moore AR, Rosztóczy AI, Wittman T, Simpson A, Dockray GJ, Varro A. Matrix metalloproteinase (MMP)-7 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: expression, metabolism, and functional significance. *Physiol Rep.* 2018 May;6(10):e13683.

Doi: 10.14814/phy2.13683; SJR **IF 0.963**

A disszertációhoz felhasznált közlemények impakt faktora: 3.799

A témához kapcsolódó közlemények kumulatív impakt faktora: **4.762**