

**TUMOR-ASSZOCIÁLT MIOFIBROBLASZTOK  
GENETIKAI, EPIGENETIKAI, TRANSZKRIPCIÓS ÉS  
FUNKCIONÁLIS JELLEMZŐI**

**HULIÁK ILDIKÓ**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**TÉMAVEZETŐK:  
PROF. DR. BOROS IMRE MIKLÓS**

egyetemi tanár

**DR. KIRICSI MÓNIKA**

egyetemi adjunktus

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2021

## **Bevezetés**

Annak ellenére, hogy napjainkban egyre szélesebb a rosszindulatú daganatok kezelésére alkalmazható terápiás készítmények köre, a tumoros megbetegedésekhez köthető elhalálozások száma még mindig meghaladja éves szinten a 30000 esetet hazánkban. Ennek hátterében részben az húzódik meg, hogy a rákterápiák döntő része a neoplasztikus sejteket célozza, figyelmen kívül hagyva a tumor mikrokörnyezetet (TME). A tumorral együtt dinamikusan változó, ko-evolváló mikrokörnyezet a daganatsejtek és a szervezet kölcsönös egymásra hatásának eredményeként alakul ki és kulcsszerepet játszik a ráksejtek viselkedésének befolyásolásában és a tumoros folyamat progressziójában. Ebben a mikrokörnyezetben a daganatos sejtek toborzásának köszönhetően számos mezenhimális eredetű sejt halmozódik fel, így egy fibroblasztokban, immunsejtekben, endotél sejtekben, pericitákban gazdag sztróma jön létre. Ugyanakkor a tumorszövet extracelluláris mátrixának (ECM) szerveződése is jelentősen megváltozik a normál szövethez képest, számos daganattípus esetén egy fibrózus, rigid mátrix jön létre, mely kedvez a tumorsejtek proliferációjának, túlélésének és invazivitásának. Ezen felül a tumor mátrix mechanikai átalakulása és az ennek következtében a tumorban létrejövő

intersticiális nyomásnövekedés nagy fokban rontja a gyógyszeres terápiák hatékonyságát.

A TME-ben legnagyobb számban fibroblaszt jellegű sejteket találunk, melyekre a szakirodalom daganat-asszociált fibroblasztokként hivatkozik (Cancer-Associated Fibroblast, CAF). A CAF sejteket heterogén sejtpopulációnak tekintjük, melyben a legnépesebb csoportot a miofibroblasztok alkotják. A fibroblasztok és simaizomsejtek tulajdonságait ötvöző, aktivált fibroblasztokként is definiált miofibroblasztokat eredetileg a sebgyógyuláshoz kapcsolódóan írták le, azonban mára ismertté vált, hogy a tumoros folyamatoknak is aktív résztvevői. Különbéféle szolid daganatok metszeteit vizsgálva megállapítható, hogy a tumorokban szignifikánsan megnő a miofibroblasztok száma és megváltozik sejtek elrendeződése is az egészséges szövethez képest és ez előrevetíti a tumor-asszociált miofibroblasztok funkcionális megváltozását is. A miofibroblasztokról a sebgyógyulás kapcsán már ismert, hogy képesek számos növekedési faktor, citokin és kemokin termelésére, ECM fehérjék szintézisére és különféle szöveti proteázok (például mátrix metalloproteinázok) szekréciójára. Mindezen képességek révén vélhetően a tumor-támogató mikrokörnyezet kialakulásában is kiemelt szerepet játszhatnak, azonban ennek pontos részletei még nem teljesen ismertek.

## **Célkitűzések**

Munkánk során célul tűztük ki gyomor-bélrendszeri tumorok sztrómájában felhalmozódó miofibroblasztok tumor-támogató fenotípusának igazolását, jellemzését. Kísérleteinkhez a tumoros betegek daganatszövetéből, valamint a tumor által nem érintett, normál szövetéből izolált miofibroblaszt sejteket használtuk és az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1, A tumorszövet miofibroblasztjainak megváltozott morfológiáját, fenotípusát genetikai változások okozzák?
- 2, Kimutathatók-e epigenetikai változások a tumor-asszociált miofibroblasztok átalakulásának hátterében?
- 3, Milyen génexpressziós eltérések teremtik meg a lehetőséget a tumor-asszociált miofibroblasztok jellegzetességeinek létrejöttéhez?
- 4, A tumor sztróma miofibroblasztjai befolyásolják-e a metasztázis létrejöttében lényeges szerepet játszó

extracelluláris mátrix összetételének és szerkezetének megváltozását?

5, A tumorokból származó miofibroblasztok migrációs aktivitásuk szempontjából különböznek-e a normál szövet miofibroblasztjaitól, alkalmasak-e arra, hogy segítsék a tumorsejtek invázióját, metasztázis képzését?

6, A miofibroblasztok tumor-támogató aktivitása összefüggést mutat-e a tumor szövettani jellemzőivel, a daganatos folyamat előrehaladottságának mértékével?

### **Alkalmazott módszerek**

1, A kísérleteinkhez használt miofibroblaszt sejtvonalak tisztaságának validálásához  $\alpha$ -SMA, vimentin és citokeratin mRNS-ek jelenlétét vizsgáltuk **konvencionális PCR**-rel.

2, A lehetséges genetikai változások feltérképezéséhez **genomi DNS izolálást** követően **újgenerációs szekvenálással variáns analízist** végeztünk.

3, Az epigenetikai (hiszton posztranzlációs) módosítások azonosítása **immuncitokémiai festéssel** és **western blot** módszerrel történt.

4, A tumor-asszociált miofibroblasztokban kialakult génkifejeződés változások felderítéséhez **RNS-t izoláltunk** és a **részleges transzkriptomikai vizsgálattal** (kis denzitású TaqMan array-jel) nyert adatokat elemeztük.

5, Az extracelluláris mátrixot emésztő és átalakító mátrix metalloproteináz (MMP) enzimek kifejeződését **kvantitatív PCR-rel** és **western blot** technikával határoztuk meg, emellett az intracelluláris és szekretált MMP2 aktivitását **zselatin zimográfiával** vizsgáltuk.

6, A tumorokból izolált miofibroblasztok migrációs aktivitását **in vitro sebzési esszével** (wound healing assay) határoztuk meg.

## **Fontosabb eredmények, tézispontok**

### **1, A daganatokban akkumulálódott miofibroblasztokban nem mutatható ki szignifikáns genetikai eltérés.**

Újgenerációs szekvenálással, tumorképződésben szerepet játszó genetikai variációkat keresve azt tapasztaltuk, hogy a daganatokból származó miofibroblasztokban nem mutatható ki nagyszámú mutáció felhalmozása. A normál miofibroblasztokban átlagosan 10, főként aminosavcsere-t okozó genetikai eltérést találtunk a referencia genomhoz képest a vizsgált genomi régiókban. A tumor-asszociált mintákban közel azonos számú szomatikus variánst detektáltunk, mint a normál sejtekben és ezen variánsok több, mint felét tolerálhatóként/benignusként azonosították a fehérje funkciót előrejelző alkalmazások.

### **2, A tumor-asszociált miofibroblasztokban megváltozott egyes hiszton poszttranszlációs módosítások mértéke.**

Az epigenetikai szabályzó mechanizmusok közül a hiszton fehérjék ismertebb poszttranszlációs módosításait vettük

górcsó alá és immunfestésekkel, valamint western blot módszerrel analizáltuk a miofibroblaszt sejtek kromatin állományát. Eredményeink azt tükrözik, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztokban szignifikánsan lecsökkent a H4K16 acetiláció, valamint a H3K9 trimetiláció szintje a normál sejt-párjaikhoz viszonyítva.

### **3, A tumor-asszociált miofibroblasztokat megváltozott génextpressziós profil jellemzi.**

Daganatok képződésével és progressziójával összefüggésbe hozható 190 gén TaqMan próba detekción alapuló transzkriptomikai analízise (TaqMan array) azt mutatta, hogy a vizsgált gének 20%-a eltérő mértékben fejeződik ki a tumor-asszociált miofibroblaszt sejtekben a normál miofibroblasztokhoz viszonyítva. A megváltozott expressziót mutató gének által kódolt fehérjék főként az alábbi folyamatokban vesznek részt: invázió-metasztázis kaszkád, extracelluláris mátrix felépítés és átalakítás, TGF- $\beta$  jelátvitel, sejtciklus szabályozás, valamint WNT szignalizáció.



#### **4, Egyes ECM proteoglikánok és glikoproteinek alacsonyabb szinten expresszálódnak a tumorokból izolált miofibroblaszt sejtekben.**

Kvantitatív PCR kísérleteket végezve azt a – TaqMan array kísérletek eredményeit is alátámasztó - megfigyelést tettük, hogy a decorin, fibromodulin, nidogen 1, perlecan és TGF- $\beta$  receptor 3 mRNS-ek szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben mutathatók ki a tumor-asszociált miofibroblasztokban.

#### **5, A daganatos szövet miofibroblasztjaiban megváltozott mátrix metalloproteináz kifejeződés mutatható ki.**

A daganatos szövetből gyakorta nagyobb mennyiségben kimutatható mátrix metalloproteinázok (MMP) közül az MMP1, 2, 3, 10 és 12-t kódoló génekről képződő mRNS-ek mennyiségét elemeztük qPCR kísérletek során. Általánosságban elmondható, hogy nagyon változatos ezen MMP gének expressziós profilja a mintapárokban, azonban minden mintapár esetén azonosítottunk olyan MMP-t, melynek expressziója megemelkedik a tumor-asszociált miofibroblaszt sejtekben. Fehérjeszinten a legtöbb mintapárban emelkedett kifejeződést mutató MMP3-at és

MMP10-et vizsgáltuk western blot kísérletek során, ahol nagyobb mennyiségű MMP3 és 10 fehérje jelenlétét mutattuk ki a tumor-asszociált miofibroblasztokban. Az enzimaktivitás szintjén tesztelt MMP2 esetén az intracelluláris enzimaktivításban nem láttunk különbséget, míg egyes mintapárokat tekintve a szekretált MMP2 aktivitás nagyobbnak bizonyult a daganatból izolált miofibroblasztok kondicionált médiumában.

## **6, A tumor-asszociált miofibroblasztok migrációs aktivitása jelentősen nagyobb, mint a normál miofibroblaszt sejteké.**

A kísérleteinkbe bevont sejtek esetén egy mintapár kivételével az igazolódott, hogy a tumor-asszociált sejtek emelkedett migrációs kapacitással rendelkeztek a normál mintapárjaikhoz képest. A migrációs kapacitás átlagosan 56%-kal nőtt meg a tumoros miofibroblasztokban.

## **7, A tumor-asszociált miofibroblasztok MMP expressziós profilja összefüggést mutat a tumor jellemzőivel, a folyamat előrehaladottságának mértékével.**

A vizsgálatba bevont betegek tumorjainak TNM beosztását, és a szövettani sajátosságokat figyelembe véve összefüggés fedezhető fel: a T4 kiterjedtségű, illetve a regionális nyirokcsomó áttétet adó daganatokból izolált miofibroblasztokban több MMP is magasabb szinten expresszálódott, illetve a génkifejeződés mértéke is számottevő volt, esetenként a tízszeres expressziós különbséget is meghaladta.

## **Összefoglalás**

Eredményeink arra utalnak, hogy a tápcsatorna különböző szegmenseiből származó tumor-asszociált miofibroblasztok az azonosított génexpressziós- és funkcionális eltérések révén közreműködhetnek a daganatsejtek invazivitásában, segítve a tumorsejt migrációt. A sejtek megváltozott fenotípusának hátterében nem genetikai változások állnak, hanem valószínűsíthetően a felismert epigenetikai módosulások járulnak hozzá a tumor-támogató jellemvonások kialakulásához.

## Publikációk listája

MTMT azonosító: 10029158

### 1. A doktori eljárás alapját képező két közlemény:

#### 1.1. A dolgozat alapját képező publikáció:

**Ildikó Huliák**, László Bodai, Mátyás Czepán, Dávid Kovács, Anikó Szabó, László Tiszlavicz, György Lázár, Zoltán Rakonczay jr, Péter Hegyi, Imre M Boros, Monika Kiricsi: *Genetic, epigenetic and transcriptional comparison of esophagus tumor-associated and adjacent normal myofibroblasts*. *Oncology Reports* 2019; 41(2): 839-852. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6909>

Q1; IF: 3.417

#### 1.2. A dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemény:

**Ildikó Huliák**, Ádám Sike, Sevil Zencir, Imre M. Boros: *The objectivity of reporters: interference between physically unlinked promoters affects gene reporter expression in transient transfection experiments*. *DNA and Cell Biology* 2012; 31(11):1580-4. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1711>

Q2; IF: 2,344

## 2. Egyéb tudományos közlemények:

Barbara N Borsos, **Ildikó Huliák**, Hajnalka Majoros, Zsuzsanna Újfaludi, Ákos Gyenis, Péter Pukler, Imre M Boros, Tibor Pankotai: *Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage*. Scientific Reports 2017; 7: 40960. <https://doi.org/10.1038/srep40960>

D1; IF: 4.122

Péter Bencsik, Krisztina Kupai, Zoltán Giricz, Anikó Görbe, **Ildikó Huliák**, Susanna Fürst, László Dux, Tamás Csont, Gábor Jancsó, Péter Ferdinandy: *Cardiac capsaicin-sensitive sensory nerves regulate myocardial relaxation via S-nitrosylation of SERCA: role of peroxynitrite*. British Journal of Pharmacology 2008; 153 (3): 488-96. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707599>

Q1; IF: 4.902

Attila Kiss, László Juhász, **Ildikó Huliák**, Ágnes Végh:  
*Intracoronary infusion of peroxynitrite protects against ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetised dogs without affecting mitochondrial KATP channels.* British Journal of Pharmacology 2008; 155(7): 1015-24. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.344>

Q1; IF: 4.902

**Összesített impakt faktor: 19,687**

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Boros Imre Miklós és Dr. Kiricsi Mónika nyilatkozunk arról, hogy **Huliák Ildikó** szerepe meghatározó jelentőségű volt a „*Genetic, epigenetic and transcriptional comparison of esophagus tumor-associated and adjacent normal myofibroblasts*” (Oncology Reports, 2019) és a „*The objectivity of reporters: interference between physically unlinked promoters affects gene reporter expression in transient transfection experiments*” (DNA and Cell Biology, 2012) című közleményekben.

Kijelentjük továbbá, hogy más jelöltnek nem adunk ki hasonló tartalmú nyilatkozatot azokról az eredményekről, melyeket a jelölt a fokozatszerzés során felhasznált.

.....  
Prof. Dr. Boros Imre Miklós

.....  
Dr. Kiricsi Mónika

Kelt: Szeged, 2021. 02. 10.