

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

---

**A HOMOLÓG ÉS HETEROLÓG SEJT-SEJT KOMMUNIKÁCIÓ ÉS  
KÖVETKEZMÉNYEINEK VIZSGÁLATA TUMOROS  
MIKROKÖRNYEZETET MODELLEZŐ MONO- ÉS  
KOKULTÚRÁKBAN**

**Tóth László**

**Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza**

---

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA  
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET  
DEBRECEN, 2001**

## 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi néhány évtized intenzív kutatásainak eredményeként ma már részben ismertek azok az intra-, inter- és extracelluláris történések, amelyek a tumoros fenotípus kialakulásához, a tumor növekedéséhez és progressziójához vezetnek. Számos tanulmány veti fel hogy a malignus transzformáció, de még inkább a tumorprogresszió folyamataiban fontos szerepe van a sejtek közötti jelátviteli folyamatokban bekövetkező mennyiségi és minőségi változásoknak is. A sejt-sejt közötti kölcsönhatások több úton is megvalósulhatnak: (1) növekedési faktorok és egyéb sejtciklust szabályozó anyagok szekrécija illetve ezek autokrin és parakrin hatásai révén, (2) a sejtek közötti direkt kontaktus és egyes extracelluláris matrix komponensek közvetítésével, (3) az intracelluláris modulátor vegyületek közvetlen cseréje által, mely a szomszédos sejtek gap junction típusú csatornáin keresztül valósul meg. Szolid tumorokban, a tumor parenchyma malignus sejtjei között és körül, mindig megfigyelhető egy, megváltozott funkciójú, gazdaszervezet eredetű sejt elemekből és sajátos struktúrájú extracelluláris matrixból, az ún. tumor matrixból szerveződő stróma. A speciális mikrokörnyezet és a tumorsejtek között igen összetett kölcsönhatásrendszer alakul ki, amely alapvető a tumorsejtek túlélése és a malignus folyamat progressziója szempontjából.

A gap junction típusú intercelluláris kommunikáció (GJIC) a szöveti homeosztázis és integritás fenntartásának fontos eleme. Igen sok sejtípus (pl. hám- és izomsejtek, fibroblasztok) expresszálja a gap junction csatornákat alkotó connexin fehérjéket és mutat kiterjedt GJIC-t. A GJIC a sejtciklus egyes fázisaiban (S-fázis) és tumor promoterek hatására (pl.: forbol észterek) csökken. A malignusan transzformált sejtek gap junction típusú kommunikációjának megszűnése, vagyis a sejt izolációja és „kiszabadulása” a szöveti kontroll alól, fontos szerepet játszik a tumoros sejtburjánzás kialakulásában. Számos intra- és

extracelluláris mediátor képes jellegzetes hatást gyakorolni a GJIC-re mind a connexin fehérjék szintézise, mind a csatornák nyitottságának szabályozása révén. A tumorsejtek által (is) szintetizált növekedési faktorok GJIC-re gyakorolt hatása eltérő: az epidermális növekedési faktor (EGF), a transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) általában csökkenti, míg a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) és a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), sejtípustól függő mértékben, növeli a GJIC-t.

In vivo az extracelluláris matrix összetétele a tumor mikro környezetében, annak progressziója során szintén karakterisztikus változásokat mutat. A tumorsejteket ill. azok csoportjait körülvevő matrixban jellemző módon fibrin, fibronectin, az I-es és/vagy III-as típusú kollagén és egyes proteoglikánok fokozott depozíciója figyelhető meg. A kötőszöveti matrixban igen gyakori a tenascin megjelenése és felhalmozódása is. A tenascin-C hexamer struktúrájú glikoprotein, amely normál felnőtt szövetekben csak nyomokban van jelen, fokozott termelődése figyelhető meg azonban az embrionális fejlődés, sebgyógyulás és neoplasztikus folyamatok során. A tenascin szintézisére különböző sejtek képesek, de szöveti felhalmozódása általában a fibroblasztok speciális aktiválódásának eredménye. Mivel a tenascin sejt kultúrában gátolja a sejtek letapadását és reexpressziója mindig valamilyen sejt vándorlással járó folyamathoz kötődik, feltételezik hogy a tenascin antiadhezív tulajdonságai révén képes elősegíteni a malignus sejtek lokális invázióját, azaz a tumor progresszióját. A tenascin EGF-szerű doméneket is tartalmaz, így az EGF-hez hasonlóan, mitotikus válaszokat generálhat EGF-receptorral rendelkező sejtekben. Immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a szaporodó epitheliális sejtek és a mesenchyma határfelületén igen struktúrált tenascin depozíció figyelhető meg, mely a tenascin expresszió szabályozásában valószínűsíti a sejt közötti kommunikáció jelentőségét.

A fenti adatok is alátámasztják, hogy a tumor sejt-gazdaszervezet kölcsönhatások szempontjából kiemelt jelentőségű a tumor sejt-fibroblaszt kölcsönhatás, mely közvetlenül és közvetve (a tumor matrix összetételének kialakítása révén) egyaránt befolyásolja a daganatok növekedését és progresszióját. A fibroblasztok homológ (egymás közötti) és heterológ (a tumor sejtekkel megvalósuló) kapcsolataik révén módosulnak és módosítanak, melyek eredője egy, a daganatprogresszió szempontjából szupportív mikrokörnyezet kialakulása.

Jelen munka azon vizsgálataink összefoglalása, melyek során sejt-kultúra modellrendszerben tanulmányoztuk, hogy hogyan alakul a fibroblasztok gap junction típusú intercelluláris kommunikációja és tenascin termelése tumorsejtek ill. tumorsejtek által kondicionált médium hatására, azzal az igénnyel, hogy adatokat szolgáltatassunk a tumorszövetben létrejövő homológ és heterológ sejt-sejt kommunikáció jellegének és szerepének jobb megértéséhez.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során homológ és heterológ sejt kultúra modellrendszerben végzett vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

### **A. Tumorsejtekkel kondicionált médium hatására**

- 2.1. - hogyan változik egér fibroblasztok GJIC-je,
- 2.2. - hogyan változik a fibroblasztok proliferációja, ill. az intercelluláris kommunikáció és a proliferáció változása milyen összefüggést mutat.

### **B. Fibroblaszt-melanóma sejt kokultúrákban**

- 2.3. - észlelhető-e tenascin reexpresszió a tenyésztés során,
- 2.4. - a tenascin depozíció mutat-e sajátos eloszlást, ill. milyen viszonyban van a kokultúra sejtjeivel,
- 2.5. - a tenascin fokozott produkciójában mely jelátviteli mechanizmus(ok) játszhat(nak) szerepet.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Mono- és kokultúra rendszerek.

WiDr (colon adenokarcinóma) és Int 407 (normál bélepithel) sejteket 4 napon át tenyésztettünk 10 % foetalis borjúsavót tartalmazó DMEM tápfolyadékban standard körülmények között. A tápfolyadékot a konfluencia elérése után leszívtuk, centrifugálással a sejtörmeléktől megtisztítottuk, majd egy napon keresztül 10-20-szoros mennyiségű eredeti tápfolyadékkal szemben dializálva a felhasználandó tápanyagokat visszapótoltuk. Az így nyert tápfolyadékot mint tumor (WiDr sejtekkel) kondicionált médiumot (TCM), ill. normál (Int 407 sejtekkel) kondicionált médiumot használtuk a Balb/c 3T3 fibroblasztok kezelésére.

A fentivel azonos módon tumor kondicionált médiumot állítottunk elő HT-168 M1, erősen metasztatikus melanóma sejtvonal, tápfolyadékából és használtuk HFFF2 foetalis fibroblaszt kultúra kezelésére. E két sejtvonalat monokultúrák előállítására használtuk ill. kokultúrájukban vizsgáltuk a tenascin reexpresszióját és eloszlását.

#### 3.2 Gap junction típusú intercelluláris kommunikáció mérése festék mikroinjekciós módszerrel.

A sejtek közötti gap junction típusú intercelluláris kommunikációt a Lucifer Yellow CH fluoreszcens marker-festék sejtről-sejtre történő terjedésének mértéke alapján határoztuk meg az egyedi sejtek mikroinjektálását követő 10. percben. A sejtbe injektált Lucifer Yellow CH csak a gap junction csatornákon keresztül képes a szomszédos sejtekbe jutni, így terjedésének mértéke a csatornák fiziológiai állapotának függvénye.

### 3.3 A sejtproliferáció mérése BrdU inkorporációs módszerrel.

A fibroblasztokat 10  $\mu\text{mol/l}$  bromodeoxyuridin (BrdU) jelenlétében tenyésztettük 1 órán át. A sejtek S-fázisában a DNS-be beépült BrdU-t indirekt immunhisztokémiai reakcióval detektáltuk egér anti-BrdU és FITC konjugált nyúl anti-egér ellenanyagok segítségével, majd propídium-jodid magfestést alkalmaztunk. A FITC jelölt (BrdU-t beépített) és a teljes sejtmagszám hányadosát használtuk a sejtproliferáció mértékének jellemzésére.

### 3.4 Tenascin megjelenítése indirekt immunhisztokémiai reakcióval.

A kezelt és kontroll monokultúrák és a fibroblaszt-melanóma sejt kokultúrák monolayerében a tenascint indirekt immunhisztokémiai reakció során poliklonális nyúl anti-tenascin immunszérum, biotinnal jelölt anti-nyúl IgG és Texas red-streptavidin felhasználásával detektáltuk. A kokultúrákban a fibroblasztokat egyidejűleg a prolil-4-hidroxiláz specifikus fibroblaszt marker reakcióval jelöltük a két sejttípus elkülönítése érdekében.

### 3.5 A tenascin depozíció kvalitatív és kvantitatív jellemzése digitális képanalizáló rendszer segítségével.

A kokultúrák tenascin termelésének jellegét és mértékét Axioplan típusú fluoreszcens mikroszkóphoz (Zeiss, Germany) kapcsolt CCD kamera és képanalizáló rendszer (ISIS, Metasystems, Germany) segítségével vizsgáltuk. Paralel kultúrákban (kokultúrákban és monokultúrákban) látómezőnként elemeztük a tenascin eloszlását és a tenascin reakció fluoreszcencia intenzitását, amit a DAPI magfestés és a fibroblaszt marker reakció alapján megállapított

melanómasejt/fibroblaszt arányszámra vonatkoztattunk. Az egyes kultúrákban minimum 20 látómező került ilyen módon elemzésre.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 Tumor kondicionált médium hatása fibroblasztok intercelluláris kommunikációjára és proliferációjára.

Tumor kondicionált-, normál bélepithel sejtekkel kondicionált- és kontroll (sejtmentes körülmények között inkubált) tápfolyadékban tenyésztett Balb/c 3T3 fibroblaszt kultúrákban követtük a sejt-sejt kommunikáció és a sejtproliferáció változásait a szubkonfluens fázistól a posztkonfluens fázisig, 36 órán át. A kezelés kezdetén, alapállapotban, a fibroblasztok kiterjedt GJIC-t mutattak (15-25 kapcsolt sejt/injektálás). A kezelés során mindkét kontrollként értékelt kultúrában (a normál bélepithel sejtekkel kondicionált- és a kontroll médiummal kezelt kultúrákban egyaránt) a GJIC kismértékű, nem szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető a kezelés 12. és 24. órája között, majd a 30. órától a sejt-sejt kommunikáció mindkét kontroll kultúrában csökkent. A kezelés során a két kontroll kultúrában a GJIC mindvégig hasonlóan alakult, köztük szignifikáns különbség nem volt kimutatható. TCM kezelés hatására a sejt-sejt kommunikáció már a hatodik órában szignifikáns (49 %-os) emelkedést mutatott a kontroll monokultúrákhoz képest és a GJIC fokozódása változó mértékben (15-40 %) a mérésorozat végéig fennmaradt.

A GJIC meghatározásával párhuzamosan jellemeztük a sejtproliferáció mértékét is BrdU inkorporációs módszerrel. A kontroll sejttenyészetekben a sejtproliferáció egészen a kezelés 24. órájáig közel konstans maradt majd a 30. órára jelentősen (20 %-al) csökkent. A TCM kezelt kultúrákban a proliferáló sejtek arányának folyamatos csökkenése volt megfigyelhető, ami a 24. és a 30. órában a kontrollokhoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult.

## 4.2 Fibroblasztok tenascin termelésének alakulása melanómasejtek hatására.

Melanóma sejt és fibroblaszt monokultúrákban, valamint a két sejt típus kokultúrájában vizsgáltuk és elemeztük a tenascin termelődését. A monokultúrákkal szemben, ahol nagyon gyenge, szinte a negatív kontrollal azonos intenzitású tenascin reakció volt megfigyelhető, a kokultúrában intenzív tenascin termelődést észleltünk. Kizárólag azok a fibroblasztok mutattak intenzív pericelluláris tenascin jelölődést, amelyek közvetlen környezetében nagyszámú melanómasejt fordult elő. A kokultúrákban a fibroblasztokhoz asszociált melanómasejtek száma, azaz a melanóma sejt/fibroblaszt arány és a tenascin reakció intenzitása között egyértelmű lineáris összefüggés volt megfigyelhető (korrelációs koefficiens,  $r=0.83$ ). Mivel a TCM-kezelt fibroblaszt monokultúrákban tenascin termelődés nem volt tapasztalható, eredményeink felvetik egy inszolubilis, a tumor sejt membránjára lokalizálható mediátor potenciális szerepét a tumor sejtek által a fibroblasztokban indukált tenascin gén reexpresszió létrehozásában.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben tumor kondicionált médiumban növényő fibroblaszt monokultúrákban, valamint melanóma sejt/fibroblaszt kokultúrákban vizsgáltuk az intercelluláris kommunikáció alakulását, ill. a tenascin repressziójának jellegét és mértékét.

Megállapítottuk, hogy:

- 5.1. A tumorsejtek által termelt és a tumor kondicionált tápfolyadékba is kiválasztott humorális faktorok hatására a fibroblasztok gap junction típusú intercelluláris kommunikációja szignifikánsan növekszik, míg párhuzamosan a proliferációjuk gátlódik.
- 5.2. Melanóma sejt-fibroblaszt kokultúrákban, a fibroblasztokban, a tenascin represszióját észleltük. A kokultúrában a tenascin heterogén eloszlása volt megfigyelhető és a pericelluláris tenascin reakció intenzitása lineárisan korrelált a fibroblasztokhoz asszociált melanómasejtek számával.
- 5.3. Melanóma kondicionált médiumban növényő fibroblaszt kultúrákban tenascin produkció nem volt megfigyelhető.

Eredményeink a melanóma sejtek és a fibroblasztok közötti kontakt szignalizáció és egy a melanómasejtek membránjában lokalizált aktív faktor szerepét valószínűsítik a tenascin szintézis indukciójában, míg a tumor kondicionált médium hatására létrejövő GJIC növekedés és sejtproliferáció csökkenés tumor sejt eredetű szekrécións termék(ek)nek a stroma sejteken érvényesülő hatására utal. Vizsgálatainkkal a rendkívül komplex

gazdaszervezet-tumor kölcsönhatás egyes mozzanatainak jobb megértéséhez járultunk hozzá.

## 6. KÖZLEMÉNYEK

### AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

**Tóth L**, Pásti G, Sárváry A, Balázs M, Ádány R: Effect of tumor conditioned medium on intercellular communication and proliferation of Balb/c 3T3 cells. *Cancer Letts*, 151: 57-61 (2000)

IF: 1,518

Szűcs S, Vámosi Gy, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, **Tóth L**, Szöllősi J, Ádány R: Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy.

*Cytometry*, 33: 19-31 (1998)

IF: 2,317

**Tóth L**, Pásti G, Ádány R: Contact stimulation of fibroblasts for tenascin production by melanoma cells (közlésre elküldve)

### IDÉZHETŐ ABSZTRAKT

Szűcs S, Vámosi Gy, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, **Tóth L**, Szöllősi J, Ádány R: Single-cell measurement of granulocyte respiratory burst with digital imaging fluorescence microscopy. *Br. J. Haematol.*, 102., 58, 1998. (abstract)