

**A WNT JELÁTVITEL SZEREPE NEM KISSEJTÉS TUDÓRÁK
KIALAKULÁSÁBAN ÉS TERÁPIÁJÁBAN**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



RAPP JUDIT

**Pécsi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerészi Biotechnológia Tanszék**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Németh Péter, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

Pécs

2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1 Nem kissejtes tüdőkarzinóma	6
1.2 Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF).....	11
1.3 Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR)	15
1.3.1 PPAR-ok szerepe a terápiában és a tumorképződésben	16
1.3.2 PPAR-ok és angiogenezis	17
1.4 Wnt jelátvitel.....	18
1.4.1 Kanonikus és nem-kanonikus jelátvitel.....	18
1.4.2 Wnt5a szerepe az angiogenezisben.....	20
2. Célkitűzések	22
3. Anyagok és módszerek	23
3.1 Etikai engedély	23
3.2 Primer sejtek és sejtvonalak	23
3.3 Kísérleti állatok	24
3.4 3 dimenziós (3D) tüdőmodell [51](Szabadalom: P0900819)	25
3.5 VEGF-A rekombináns lentivirális konstrukció létrehozása és hF11 sejtvonala transzfektálása	25
3.6 Rekombináns fehérjék és egyéb kezeléshez használt anyagok.....	26
3.7 RNS izolálás, cDNA készítés	26
3.8 Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR).....	27
3.9 Taqman array plate.....	28
3.10 TaqMan microRNA assay.....	28
3.11 Beágyazás és metszetkészítés	28
3.12 Immunfluoreszcens festés	29
3.13 Hematoxilin-eozin festés.....	29
3.14 PPRE riporter assay.....	30
3.15 PPARgamma agonista és antagonisták kezelése	31
3.16 HMVEC-L migrációs kísérlet	31
3.17 Áramlási citometriás mérés.....	31
3.18 Statisztikai analízis.....	32

4. Eredmények.....	33
4.1 VEGF-A expresszió az öregedő tüdőben.....	33
4.2 PPARgamma és VEGF-A génexpresszió humán AC és SCC mintákból.....	34
4.3 Wnt jelátviteli molekulák a primer nem kissejtes tüdőkarinómákban	36
4.4 A kanonikus Wnt jelátviteli útvonal szerepe a PPARgamma aktivációjában..	38
4.5 In vitro 3D tüdőmodell.....	42
4.6 mikroRNS-ek szerepe az angiogenezisben	44
4.7 A Wnt5a hatása az endotélsejtek proliferációjára	47
4.8 Wnt5a és kadherineik	52
4.9 A Wnt5a szerepe a sejt migrációban	55
5. Összefoglalás	58
6. Új eredmények, következtetések	62
7. Referenciák.....	64
8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	74
9. Kongresszusi előadások jegyzéke	74
10. Köszönetnyilvánítás.....	75
11. Mellékletek	76

Rövidítések jegyzéke

15d-PGJ2: 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2

AC: adenokarcinóma

ALK: anaplastic lymphomakinase

ALK: anaplasztikus limfóma kináz

ANOVA: variancia analízis

APC: allophycocianin

COX: ciklooxygenáz

DMSO: dimetil-szulfoxid

EGFR: epidermális növekedési faktor

EGM-2: endotél növekedési médium

F11: fibroblaszt sejtvonala

FBS: borjú szérum

FDA: Food and Drug Administration

FGF: fibroblaszt növekedési faktor

FGFR: fibroblaszt növekedési faktor receptor

FGM-2: fibroblaszt növekedési médium

FZD: Frizzled

GFP: green fluorescent protein

HIF-1alpha: hipoxia indukált faktor 1-alfa

HMVEC-L: mikrovaszkuláris tüdő endotélsejt

IL-1beta: interleukin 1 beta

IWR-1: kanonikus Wnt jelátvitel inhibitor

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LC: nagysejtes tüdőkarzinóma

miR: mikroRNS

NHLF: normál humán tüdő fibroblaszt

NSCLC: nem kissejtes tüdőrák

PBS: foszfát puffer

PCP: planar cell polarity

PCR: polimeráz láncreakció

PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor

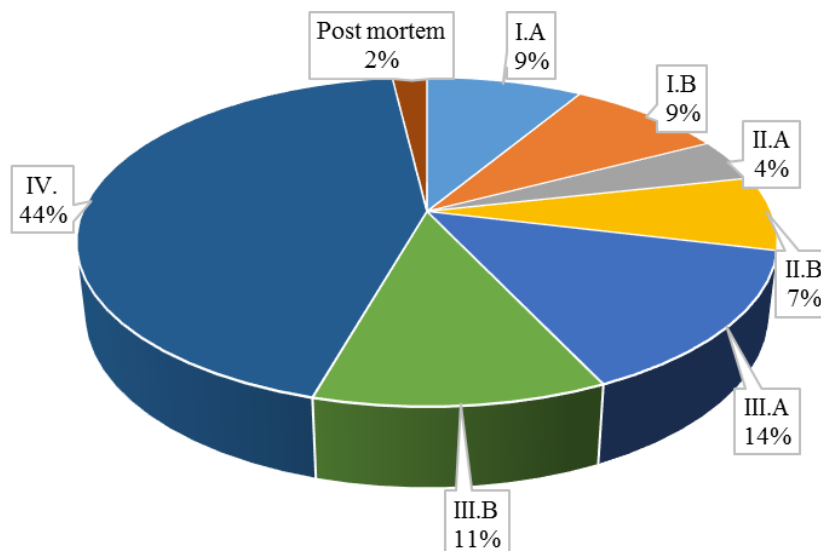
PFA: paraformaldehid

PIGF: placentáris növekedési faktor
poly-HEMA: poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
PP: peroxiszóma proliferátor
PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
PPARgamma KO: PPARgamma knock-out
PPRE: PPAR responsive element
RSG: roziglitazon
S100A: S100 kalcium kötő fehérje A7
SAEC: kis légúti epitélsejt
SAGM: epitél növekedési médium
SCC: laphámkarcinóma
SOD: szuperoxid dizmutáz
TTF-1: tiroid transzkripció faktor 1
TZD: thiazolidinedion
VEGF-A: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A
VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

1. Bevezetés

1.1 Nem kissejtes tüdőkarcinóma

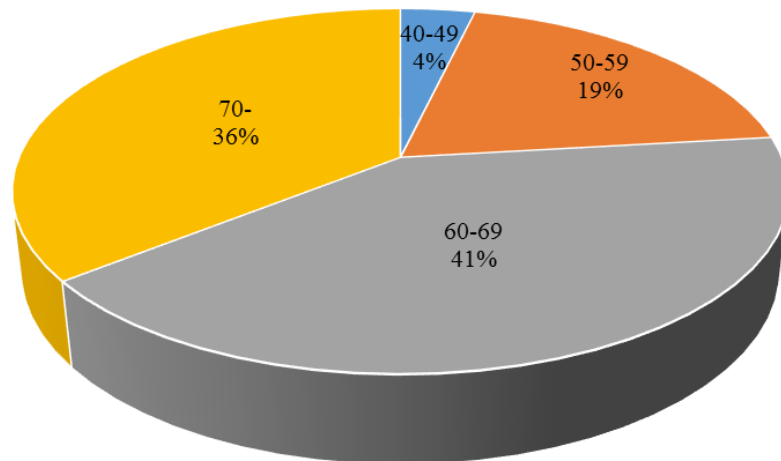
A tüdőkarcinómák a légzőfelületet alkotó epitél rétegből eredeztethető karcinómák, melyek két fő csoportba oszthatók: 85%-át a nem kissejtes, 10%-át a kissejtes karcinómák adják, a fennmaradó 5%-ot az egyéb hisztológia csoportok alkotják. A tüdőrák mindkét nem esetében vezető haláloknak számít világszerte a daganatos megbetegedések közül [1]. A nem kissejtes tüdőkarcinómán belül további három főbb csoportot lehet elkülöníteni a hisztológiai különbségek alapján: adeno (AC)-, laphám (SCC) és nagysejtes karcinóma (LC). A tüdőkarcinóma kialakulásának kezdeti szakaszában a beteg tünetmentes, a diagnózis felállításakor azonban már legtöbbször előrehaladott, nem operálható állapotú tumor azonosítható. Kezdeti stádiumban lévő, operálható tumorról diagnosztizált betegek mindössze az esetek 20%-ában fordulnak elő. A magyarországi statisztikák is hasonló tendenciáról számolnak be. A 2015. évi betegadatok alapján az újonnan nyilvántartásba vett betegek 44%-át a IV. stádiumban diagnosztizálták [2] (1. ábra). Többek között ez is szerepet játszhat abban, hogy az 5 éves túlélés világszinten mindössze 15% körül mozog [3] [4].



1. ábra: A 2015. évben újonnan diagnosztizált tüdőrákos esetek onkológiai stádiumok szerinti eloszlása Magyarországon [2].

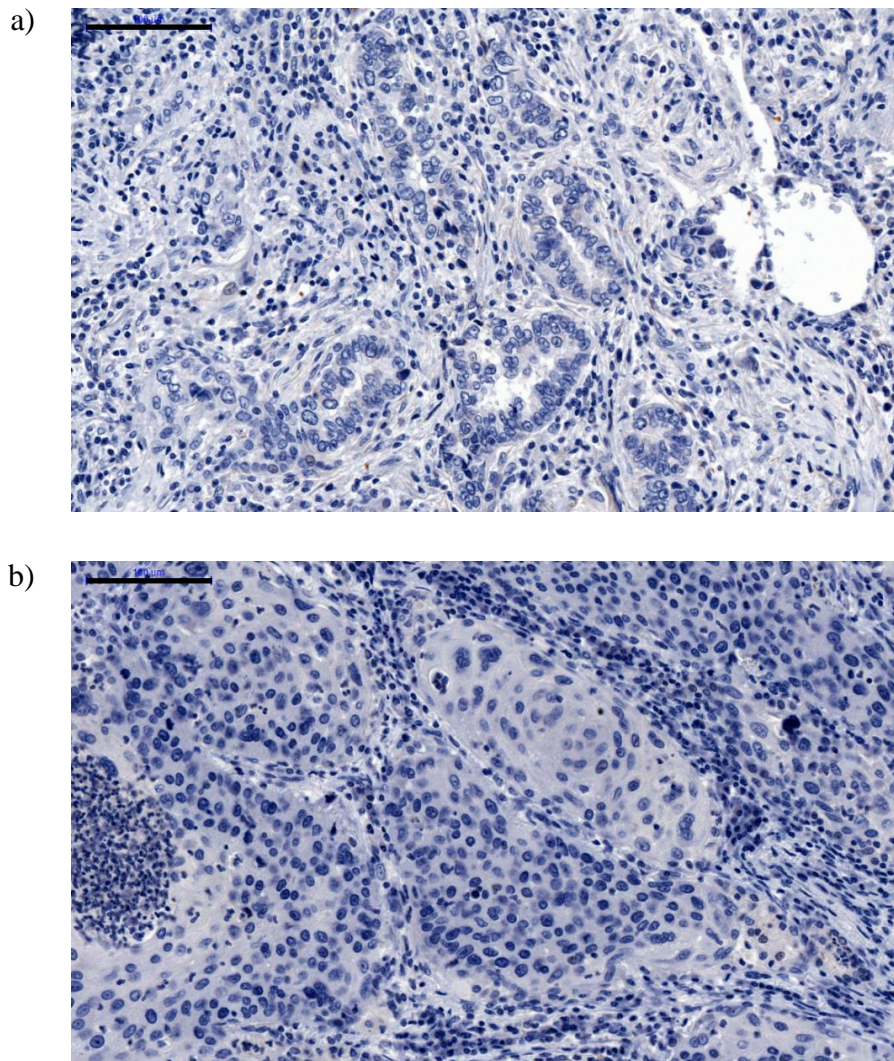
A tüdőrákot gyakran nevezik öregkori betegségnek is, mivel fiatal korban, azaz kb. 40 éves kor alatt alig fordul elő. Az életkor előrehaladtával viszont a tüdőrák gyakorisága egyre nő. A tüdőszövet öregedése során a szerkezeti és sejtes elemek összetételének megváltozása a hasznos légzőfelület csökkenéséhez vezet. Az életkorral csökkenő szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitása, a reaktív oxigéngyökök felhalmozódása DNS javítási problémákhoz vezet, mely negatívan befolyásolja a szöveti javító mechanizmusok hatékonyságát így vezetve végül a funkció csökkenéséhez [5]. A szeszencencia számos, korrall együtt járó betegséggel és a tumorok képződésével is összekapcsolható. Az öregedés sejtszinten megvalósuló folyamatai sokban hasonlítanak a sejtek tumoros irányba történő átalakulása során tapasztaltakkal [6].

A National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results program keretén belül leírt elemzése alapján a tüdőrákok mindössze 2%-a fordul elő a 45 év alattiak korcsoportjában [6], több mint 50%-a pedig 70 éves kor felett diagnosztizált. A magyarországi adatok sem térnek el nagyban a NCI statisztikáitól, a 2015. évi regisztrált betegpopuláció kevesebb, mint 1%-a 40 év alatti, míg a megbetegedések több, mint 76%-a 60 éves kor felett diagnosztizált, vagyis a tüdőrákok kialakulása összekapcsolható az életkor növekedésével [2] [7] (2. ábra).



2. ábra: Tüdőrákos esetek százalékos előfordulása a 40 év feletti korosztályokban Magyarországon. Az adatok a 2015. évben regisztrált összes beteg előfordulását mutatják [2].

Nem kissejtes tüdőrákon belül a leggyakrabban előforduló kórkép az AC, melynek azonosítása azonban problémás, mivel nem társítható egy kizárólagos szövettani képpel, hanem gyakran kevert morfológiát mutat (acináris, papilláris stb.) [8]. A WHO 2004-ben kiadott osztályozása alapján a tüdődaganat az AC csoportba sorolható, ha az epitél eredetű tumor mucint termel és acináris, papilláris, bronchoalveoláris vagy szolid tumor vagy ezek keveréke. SCC altípusról beszélhetünk, amennyiben a malignus epiteliális tumor keratinizált és/vagy intracelluláris hidak figyelhetők meg, amelyek a bronchiális epitéliumból erednek [9].



3. ábra: A nem kissejtes tüdőrák két fő altípusának szövettani képe. a) AC, b) SCC. 20x-os nagyítás, lépték 100 μ m.

Emellett jellemző festődés alapján is tovább differenciálható a diagnosztizált nem kissejtes tüdőrák. Az AC immunhisztológiai vizsgálata szerint nagy arányban mucin, tiroid transzkripciós faktor 1 (TTF-1) és citokeratin 7 pozitivitást mutatnak. SCC tumorokra a citokeratin 5/6, p63 és S100 kalcium kötő fehérje A7 (S100A7) festődés a jellemző. Ennek ellenére a tüdőrákon belüli osztályozás nehézkes, patológusok között is változhat az egyes alcsoportokba való besorolásuk [10].

A diagnózis mellett az adott karcinóma progressziós állapotát is fontos meghatározni, mivel ezen állapot azonosításától függ az alkalmazott kezelés típusa. A diagnosztizált tüdőtumorkok jelenlegi osztályozása: I. stádium: a tumor csak a tüdőben helyezkedik el, a nyirokcsomókban nem azonosítható rákos elváltozás. II. stádium: a tumor a tüdőben lokalizálódik, viszont a közeli nyirokcsomókban azonosítható daganatos elváltozás. III. stádium: a daganat továbbra is a mellkason belül helyezkedik el, de a tumorsejtek a nyirokcsomókban is megjelennek. Attól függően, hogy a kóros elváltozást mutató nyirokcsomók a kialakulás helyén találhatóak vagy attól távolabb, a III. stádium két altípusát különítjük el. Előző esetben IIIA, utóbbi esetben IIIB stádiumról beszélhetünk. IV. stádium: A legsúlyosabb formája a tüdőráknak, mely esetben a daganatos elváltozás mindkét tüdőfélre kiterjed, illetve metasztázisokat képez a test távolabbi pontjain [11]. A betegség korai szakaszában (I-II. stádium), illetve IIIA stádiumú betegeknél sebészeti beavatkozás az elsődleges terápia. Az 5 éves túlélési ráta 43-50% közötti a korai fázisban felismert betegség esetén, míg későbbi stádiumokban drasztikusan csökken [12]. Annak ellenére, hogy a tumor sebészi úton történő eltávolítása kedvező kimenetelű lehet, sok betegnél mégsem alkalmazható. Ezért legtöbbször az előrehaladott kor és a nem megfelelő fizikai állapot a felelős. Ilyen esetekben lokális sugárterápia alkalmazható, viszont ennek sikere nem közelíti meg a műtéti beavatkozás eredményeit. A tumor eltávolítását követően a betegek adjuváns kemoterápiában részesülhetnek, melynek kimenetele nagyban függ az eredeti tumor stádiumától. A Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation adatbázisból kitűnik, hogy a műtétet követő cisplatin alapú adjuváns terápia alkalmazása esetén a túlélés 5,4%-kal növelhető volt az adjuváns kezelésben nem részesült kontroll csoporthoz képest. Azonban a túlélési értékek nem minden stádium esetén értelmezhetőek pozitív változásként, szignifikáns változás csak a II-es és IIIA stádiumú betegeknél volt kifejezett [13]. A legsúlyosabb esetet leíró IV. stádiumban lévő betegek esetében a metasztázisok kezelésére csak a kemoterápia az egyetlen lehetőség. Az NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group több klinikai

kísérletet összesítve írta le, hogy a kemoterápia alkalmazása szignifikáns javulást eredményezett a végső stádiumú betegek túlélésében [14].

A fent említett műtéti és terápiás megoldások mellett egy külön csoportot képviselnek az úgy nevezett célzott terápiás szerek. A hisztológiai besorolás alapján történő kezelés kiválasztása átalakulni látszik, egyre jelentősebb szerepet tulajdonítva a tüdőkarcinómát érintő „driver” mutációknak. Ahogy a legtöbb szolid tumort, úgy a tüdőtumorokat is számos gén mutációjával jellemezhetjük. Átlagosan 33-66 gén szomatikus mutációját azonosították a gyakori szolid tumorokban, amely alól kivételt képeznek a 200-nál is több azonosított mutációval rendelkező kis és nem kissejtes tüdőrákok egyaránt. Ez a jelentős számbeli eltérés a mutagén környezeti hatások szerepét sugallja, melyek között a dohányzás kiemelkedő jelentőségű. Hozzávetőlegesen 10%-kal több szomatikus mutáció mutatható ki dohányos betegekben kialakult tüdőtumorban a nem dohányzó kontrollokhoz képest [15]. A széles mutációs spektrum és az egyének közti változatosság a terápia személyre szabását sürgeti, amely szerencsére kezd a napi klinikai gyakorlat részévé válni. Ezen a területen főként AC esetében figyelhető meg igazi terápiás siker, mivel rutinszerű genotipizálásával olyan célpontokat azonosítottak, amelyek hatékony terápiás célpontként működnek. SCC esetében az áttörés még várat magára, ugyanis genetikai jellemzése rövid múltra tekint vissza [16]. Míg az AC jellemezhető KRAS, EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) mutációkkal és ALK átrendeződéssel, addig e mutációk nem találhatók meg SCC esetekben. Irodalmi adatok alapján az EGFR mutáció előfordulási valószínűsége az ázsiai populációban magasabb (17,4-66,3%), a kaukázusiban alacsonyabb (7-17%) [17]. Az aktiváló EGFR mutációk alatt a leggyakrabban a tirozin-kináz domaint kódoló 18. és 21. exon pontmutációit, illetve a 19. exon in-frame delécióját értjük. Az említett aktiváló mutációk jelentik az EGFR tirozin-kináz inhibitorra szenzitív fenotípust. A 20. exont érintő pontmutációt EGFR tirozin-kináz inhibitor rezisztenciával együtt írták le. Az epidermális növekedési faktor jelátviteli útvonalát blokkoló monoklonális antitest (cetuximab) nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Több klinikai kísérletsorozat vizsgálta kombinált terápiában, azonban szignifikáns javulást a túlélésben nem tapasztaltak [18]. Ezzel ellentétben az EGFR intracelluláris részében elhelyezkedő tirozin-kináz domaint gátló erlotinib és gefitinib hatékonyan növelni tudta a progresszió nélküli állapotot, azonban csak az egy bizonyos mutációt hordozó betegcsoport esetében. Így a siker korlátozott, csak a tirozin-kináz domaint kódoló 18-21-es exon

mutációját hordozó csoportban figyeltek meg szignifikáns javulást a túlélési statisztikákban [19]. Az ALK átrendeződés az AC betegcsoport kb. 4%-ban fordul elő [20]. A 2-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő ALK gén 19. intron régiója egy inverzió következtében fúzionál az EML4 gén 13. intron szakaszával, melynek eredményeképpen egy rendellenes fehérje jön létre. Az ALK átrendeződéssel azonosítható betegeknél alkalmazható már egy, az amerikai gyógyszer engedélyezési hatóság, az FDA (Food and Drug Administration) által jóváhagyott szer, a crizotinib [21].

A fent említett két mutáció jellemzően a nem dohányzó, AC-val diagnosztizált betegpopulációra jellemző, míg a kaukázusi etnikumban leggyakrabban előforduló (13-26%) KRAS mutációs státusz tipikusan dohányzással asszociált [17]. Előfordulása kizárja az EGFR és ALK mutációk jelenlétét. Jelenleg nincs célzott terápia a KRAS mutációval rendelkező betegek számára.

A fent említett AC esetekben azonosított mutációk azonban nem bizonyultak sikeres terápiás célpontoknak SCC esetén [22]. Ebben a tumortípusban két membrán tirozinkináz receptor mutációt azonosítottak, mely mutációkat célzó terápiás szerek in vitro tesztelése biztató eredményeket mutat. A DDR2 mutáns sejtek érzékenyek a dasatinib kezelésre [23], míg a fibroblaszt növekedési faktor receptor (FGFR1) mutációval rendelkező nem kissejtes tüdőrákból származó sejtvonal növekedését egy kis molekulájú inhibitor gátolni tudta [24].

A két említett karcinómatípus nem csak mutációk szintjén mutat különbséget, a tumorban található erek és a tumor vérellátottsága is eltér [25]. Az érképzés a tumornövekedés egy sarkalatos pontja, segítségével megnő a kockázata a tumor gyorsabb növekedésének és a metasztázisok képződésének. Így nem meglepő, hogy a legszélesebb körben vizsgált célzott terápia középpontjában a tumor érképződésének gátlása áll.

1.2 Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)

A metabolikus aktivitás fenntartásához minden szövetnek szüksége van oxigénre és tápanyagokra, ugyanakkor a metabolikus végtermékek sem halmozódhatnak fel, elszállításuk hiányában anyagcsere zavarok jöhetnek létre. Bármelyik útvonalról is legyen szó, a szöveteket behálózó, elágazó érrendszer biztosítja a szövetek számára a

folyamatos anyagcserét. In vivo körülmények között két főbb érképződési mechanizmust különíthetünk el, a vaszkulo-és az angiogenezist. A vaszkulogenezis egy de novo folyamat, mely leginkább a prenatális időszakban jellemző. A folyamat során az endotél progenitor sejtek differenciálódása és a kapilláris érképzés zajlik. Angiogenezisről már létező erekből történő leágazások kialakulása során beszélünk. A fejlődés kezdeti szakaszában a vaszkulogenezis dominál, amelyet az angiogenezis követ. Megjelenésük azonban átfedhet, az agy és vese kialakulásában az angiogenezis szerepet játszhat már a prenatális időszakban [26]. A tüdő fejlődésének korai szakaszában szintén mindkét folyamat részt vesz [27]. A két említett folyamat közös szereplője az érképzési folyamatok leginkább vizsgált molekulacsaládjá, a VEGF és receptorai. A VEGF családon belül ez idáig hét különböző fehérjét azonosítottak, név szerint VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F és PlGF [28]. A felsorolt molekulák közvetlen receptoron keresztüli kapcsolódásuk révén működnek, mely receptorok a VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1/KDR és VEGFR-3/Flt-2. Eltérő affinitással kapcsolódhatnak a VEGF molekulák az említett receptorokhoz, így eltérő hatásokat közvetítenek, attól függően, hogy a jel mely receptoron keresztül továbbítódik. A VEGFR-1-en keresztüli jeltovábbítás elsősorban a patológiás érképződést, a VEGFR-2-n közvetített hatás a normál érképződést, míg a 3-as típusú receptor a limfangiogenezist serkenti [29].

A család leginkább vizsgált tagja a VEGF-A, amely az emberi szervezeten belül eltérő izoformákban fordul elő. A VEGF-A gén a 6. kromoszómán helyezkedik el és 8 exon építi fel. A teljes hosszúságú RNS molekulából alternatív splicing útján eltérő hosszúságú izoformák képződnek, úgy, mint VEGF121, VEGF145, VEGF162, VEGF165, VEGF183, VEGF189 és VEGF206. Az egyes formák az őket felépítő aminosavak száma után lettek elnevezve, funkciójukat tekintve pedig a heparin kötő képességükben különböznek [30]. Egérben szintén mindegyik említett forma előfordul, viszont a humán szervezettel ellentétben egereknél egy aminosavval rövidebb formában, melyre az ott használatos elnevezésük is utal (VEGF120, VEGF164, VEGF188 stb.). Felnőtt korban, normál szöveti környezetben a VEGF165 izoforma van jelen legnagyobb mennyiségben, azonban egérben a VEGF165 izoformának megfeleltethető 164 aminosavból álló változat együtt jár a tumor nagyobb méretével és gyors növekedésével. Egy 2000-ben megjelent publikációban retrovirális alapú konstrukció felhasználásával VEGF knock-out sejt vonalakat készítettek [31]. Kizárólag

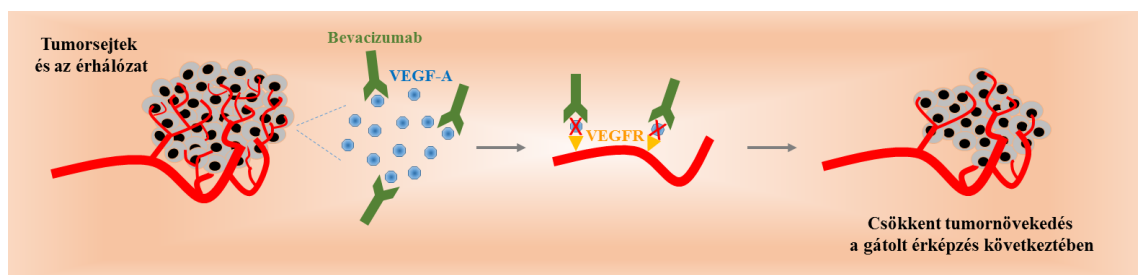
egy izoformát expresszázó tumor sejtek injektálásával előállított egér xenograft modellekben tumorképződést generáltak, mely kísérletsorozatban kimutatták, hogy az eltérő variánsokhoz különböző fenotipikus változások társíthatók. Leírták, hogy VEGF120 izoforma jelenlétében a tumor érellátottsága alacsony szintű, csak kevés számú és elágazású nagy erek jelentek meg. Emelkedett VEGF188 izoforma esetében a tumor vaszkularizáltsága rendkívül magas, de a megfigyelt erek vékonyak a vad típusú VEGF molekulákat expresszázó tumor kontrollhoz képest. Ezzel szemben a VEGF164 izoforma képes volt a vad típusúhoz hasonló érálózat kialakítására a tumorban [31]. Összegzésképpen megállapítható, hogy a VEGF164/165-nak központi szerepe van az angiogenezis irányításában, azonban a többi izoforma jelenléte is szükséges. Kizárólagos expressziójuk nem képes a vad típusú állapotot rekonstruálni, mely azt sugallja, hogy az izoformák egy rendszerezett séma szerint működnek együtt.

Fiziológiai körülmények között megismert szerepe mellett a VEGF molekulát a patológiai érzékelés fő regulátoraként tartják számon [29]. Egy bizonyos mérethatárig a tumor minden szükséges tápanyagot magához tud venni diffúzió útján, viszont a 200 µm-es diffúzió határ átlépése után hipoxia lép fel a tumor belsejében. Oxigén hiányában a hipoxia által indukált HIF-1alfa hidroxilálása és degradációja gátolt. A HIF-1alfa stabilizálódásának következtében a VEGF szint megemelkedik, amely a pro- és anti-angiogenezis folyamatok egyensúlyának megbomlásához vezet. Normál szöveti környezetben az inhibitorok és aktivátorok kiegyenlítik egymást, koncentrációjukban bekövetkező változás azonban a tumor érzékelésének kedvez [32]. Ezt a jelenséget angiogenezis váltásnak („angiogenic switch”) nevezi az irodalom [33]. A tumor tehát a fejlődése során érzékelést indukálhat, azonban az egészséges szövetekkel ellentétben a tumor abnormális erekkel rendelkezik. A tumorban található erek eltérő mivolta továbbra is kutatások tárgyát képezi, ugyanis kialakulásuk pontos mechanizmusa még nem ismert. Annyi bizonyos, hogy a tumorokban található erek különböznek az egészséges szövetekétől, a leírt erek fenotípusban és átjárhatóságban is eltérnek. A VEGF164/165 izoforma szerepe egyértelműnek látszik a tumor érzékelésében, azonban egyes tumor típusok fenntartása nem igényel további VEGF általi szabályozást. Ez is magyarázatként szolgálhat arra, hogy VEGF blokkoló szerek terápiás alkalmazása miért jár egyes esetekben sikerrel, más esetekben viszont sikertelenséggel [34].

Az az elképzelés, hogy az angiogenezist terápiás célpontként alkalmazzák, Judah Folkmantól származik az 1970-es évekből [35]. Az eredeti koncepció azóta is fennáll és

számos megközelítés látott napvilágot. 2004-ben, az első humanizált anti-VEGF monoklonális antitest, vagyis bevacizumab jóváhagyásával kezdetét vette az anti-VEGF terápia klinikai alkalmazása vastagbél karcinómák esetében [36].

Alkalmazása hamar kiterjedt más daganattípusokra, többek között nem kissejtes tüdőrákra is. Az első időszakokban elért sikerek ellenére azonban az összesített javulás csekély mértékű. A kezelésre adott válasz és a mellékhatások mértéke nagyban összefügg a nem kissejtes tüdőrák altípusok hisztológiájával. Míg az AC hisztológiai csoportba tartozó betegek megnövekedett túlélést mutatnak, addig SCC altípusban szenvedő betegek súlyos vérzéssel járó tüneteket produkáltak [37] [38]. Az anti-VEGF terápia sikertelenségének hátterében számos mechanizmus állhat [39]. Több vizsgálat szerint a tumoros érképzés VEGF általi szabályozásának gátlása csökkenti a normál ereket alkotó endotélsejtek regenerációs képességét is, valamint gyengíti az erek falát alkotó endotél réteget és nekrozist okoz. A két daganat intratumorális érhalójában található különbségek is megoldással szolgálhatnak az eltérő reakcióra. Kojima és munkatársai leírták, hogy az AC betegcsoportban szignifikánsan nagyobb a kis erek száma az SCC mintákhoz képest [25]. Más kutatócsoport is hasonló eredményre jutott, miszerint az AC esetekben szignifikánsan magasabb a mikrovaszkuláris érhalóját sűrűsége [40]. Az újonnan képződő erek állapotának vizsgálata során derült ki, hogy az SCC esetekben vizsgált ereket körülvevő periciták száma kevesebb az AC mintákhoz képest, amely sejtek hiánya a képződő ereket gyengébbé teszi. A sérülékeny falú erek ezért növelhetik az intratumorális vérzés kialakulásának esélyét [41].



4. ábra: A bevacizumab érképzést gátló hatásának mechanizmusa.

Ezen okok összessége, valamint a tumor fő erekhez való közeli lokalizációja magyarázatot adhat a sikertelen anti-angiogenikus terápiára az SCC esetében [42]. Az SCC terápiáját tovább nehezíti, hogy számos angiogenezist célzó klinikai kísérletből a

súlyos mellékhatások miatt az SCC hisztológiával rendelkező pácienseket kizárják. Jelenleg is futó LUME-Lung fázis I és III-ban lévő klinikai tesztek során a nintedanib (BIBF 1120; Boehringer Ingelheim; Ingelheim, Germany; VEGF, FGF és PDGF receptorokat célzó tirozin-kináz inhibitor) és placebo plusz docetaxel együttes alkalmazását vizsgálják IIIB/IV-es stádiumú NSCLC betegek csoportjában, melyben az AC betegek mellett szerepelnek SCC esetek is. Ehhez hasonlóan a pazopanib (Votrient, GlaxoSmithKline; London, UK; szintén VEGF, FGF és PDGF receptorokat célzó tirozin-kináz inhibitor) klinikai kipróbálása során is olyan betegcsoportot állítottak össze, amely nem zárja ki egyik hisztológiai csoportba tartozó nem kissejtes tüdőrákkal diagnosztizált beteget sem [37]. A jelenlegi vélekedés szerint a VEGF útvonal vagy a VEGF molekula kizárólagos gátlása nem elegendő az angiogenezis gátlására, ugyanis a tumorsejtek könnyen képesek alternatív útvonalakon keresztül érékpeződés indukálására [43]. Ezen megfigyelésekből kiindulva az angiogenezisben szerepet játszó egyéb útvonalak feltérképezése és együttes gátlása sikert hozhat az anti-tumor terápiában [39], de a folyamatok alaposabb megismerése elengedhetetlen a terápiás célpontok további azonosításához.

1.3 Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR)

A PPAR molekulák a magi hormon receptorok (NHR) családjába tartozó transzkripciósfaktorok. Az 1990-es évek elején, rágcsálókön végzett kísérletek alapján írták le először ezt a molekulacsaládot, mint a peroxiszóma proliferációt indukáló magi receptor molekulákat [44]. A PPAR-ok fontos molekuláris szabályozói a sejt zsírtárolásának és metabolizmusának, melyek főként a lipoxigenáz és ciklooxygenáz (COX) útvonalból származnak. A PPAR családon belül 3 izoforma különíthető el, melyek egyedi, szövetspecifikus expressziójuk és az általuk szabályozott folyamatok alapján kerültek csoportosításra. A PPARalpha főként a májban, vesében, bélrendszerben, szívben, izomszövetben, barna zsírszövetben, hasnyálmirigyben fejeződik ki. A PPARbeta szélesebb spektrumú expressziót mutat, a szövetek közti eltérést a kifejeződés mértékében sikerült eddig detektálni. A harmadik izoforma, a PPARgamma megtalálható a zsírszövetben, májban, szívben, vesében, hasnyálmirigyben, lépben és a tüdőben is [45]. Sok esetben a PPAR izoformák expressziója átfedést mutat, azonban az általuk irányított eltérő szabályozási mechanizmusok mégis különbözővé teszik őket [46]. A PP receptor család első azonosított tagja a PPARalpha, melynek leginkább ismert funkciója az energiaháztartás szabályozása. Ezen feladatát a zsírsavak

katabolizmusán, a glükoneogenezis és ketontest szintézisen keresztül látja el. Mindemellett az aminosav és urea szintézis, valamint egyes gyulladáshoz vezető folyamatok fontos résztvevője [45]. A PPAR receptorok következő tagját a *Xenopus oocytes* izolálása során azonosították. Mivel a *Xenopus* PPAR δ génnel nem szükségképpen homológ az emlősök PPAR β génje, így az egérben történő azonosítását követően PPAR δ -ként nevezték el [47] [48]. Elsődlegesen az embriogenezisben betöltött szerepe ismert, viszont aktív szabályozója a bőr sebgyógyulásának, illetve a hipertóniás stressz okozta vesekárosodást követő regenerációs folyamatnak [49]. A receptor család harmadik tagja a PPAR γ , amelyet főként az adipocita differenciációval, az energia fehér zsírszövetben való tárolásával és a barna zsírszöveten keresztüli átalakításával hozhatunk szorosabb kapcsolatba. Gan és munkatársai már 2008-ban leírták a PPAR γ szerepét a sejtszintű öregedési folyamatokban. Kimutatták, hogy a p16-nak, egy sejtciklus gátló molekulának az akkumulációja sejtöregedéshez vezet. Szabályozása PPAR γ függő, ugyanis PPAR γ jelenlétében a p16 akkumulálódik, így indukálva a szenescencia folyamatát [50]. Kutatócsoportunk a PPAR γ molekulát a tüdőben zajló öregedési folyamatok célpontjaként azonosították. Leírták, hogy az öregedéssel megnövekedő Wnt4 a beta-katenin függő útvonalon keresztül csökkenti a PPAR γ expresszióját. A PPAR γ mennyiségi csökkenése lipofibroblasztok csökkenéséhez is vezet, amelyek nélkül az ATII-es epitélsejtek nem képesek trigliceridek felvételére. Ennek következtében a disztális tüdő érzékennyé válik a sérülésekkel, a krónikus gyulladással szemben, valamint károsodik a regenerációs képessége [51].

1.3.1 PPAR-ok szerepe a terápiában és a tumorképződésben

A PPAR γ közvetlenül is kapcsolatba hozható a daganatok kialakulásával. A PPAR γ aktiválása gátolja a monociták és makrofágok gyulladáshoz vezető válaszreakcióit az NF-KappaB, AP1 és STAT1 transzkripciós faktorok aktiválásának megakadályozásával, ezzel gátolva az atherogenezis kialakulását [52]. A PPAR γ ligandok anti-tumor aktivitásuk miatt kerülnek egyre inkább a kutatás célkeresztjébe, mivel sok sejttípusban csökkentik a sejtosztódást és számos tumorban, pl. máj, emlő és vastagbél AC mintákban apoptózist indukálnak [49] [53]. Tüdő AC esetében megfigyelték, hogy aktivációja képes blokkolni a sejtciklust és apoptózist indukálni, illetve a differenciáció állapotának módosításán keresztül az invazivitást szabályozni [54]. Szélesebb feladatkörének bizonyítékeként számos szövetben, többek között a

tüdőben zajló gyulladásos folyamatoknak PPARgamma általi szabályozását is leírták. Wang és munkatársai bizonyították, hogy a PPARgamma a tüdő légzőfelületét alkotó epitelsejtek által folyamatosan termelődik és szelektív aktivációja gyulladásos mediátor molekulák felszabadulását gátolja [55].

Valamilyen módon mindhárom PP családba tartozó receptor kapcsolatba hozható metabolikus rendellenességgel vagy tumor kialakulásával. Lehetséges terápiás alkalmazásuk főként szintetikus ligandok előállításánál került előtérbe. A PPARalpha esetében a szintetikus ligandjaként használt fibrátot a dyslipidémia kezelésekként alkalmazzák az elmúlt évtizedtől kezdődően. A thiazolidinedionok (TZD-k), mint PPARgamma agonisták a II-es típusú diabetes kezelésében alkalmazott ligandok [56]. PPARdelta esetében csak II. fázisú klinikai kísérletben használt agonistáról (GW501516) lehet beszámolni, amelyet egyelőre sikeresen alkalmaztak dyslipidémia és elhízás kezelésére [57] [58]. Azonban a PPAR agonisták hosszú távon való alkalmazása elővigyázatosságra int, ugyanis több, a közelmúltban megjelent publikáció utal a karcinogenezis indukálásában betöltött lehetséges szerepükről [59]. A PPARalpha agonista folyamatos adagolása májdaganat fejlődését okozta egerekben, míg PPARalpha knock-out egerekben ugyanez a hatás elmaradt, bizonyítva, hogy a hatást a PPARalpha szabályozza [60]. PPARgamma agonista esetében megfigyelték, hogy a vastagbél daganat xenograft modelljében a PPARgamma aktivációja gátló hatással van a tumor kialakulására, ugyanakkor Apc mutáns egerek esetében az agonista folyamatos adagolása növelte a tumorok kialakulását [61].

1.3.2 PPAR-ok és angiogenezis

A PPARgamma szerepe az adipocita differenciációban és a glükóz homeosztázis fenntartásában már ismert, szerepe azonban ennél többre terjed. PPARgamma az érhalózat minden sejtípusában kimutatható, azaz endotelsejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, monociták/makrofágok mind expresszálnak PPARgamma-t. Nem meglepő ezért, hogy számos irodalmi hivatkozást találunk a PPARgamma angiogenezisben betöltött szabályozó szerepéről, hiszen természetes ligandjai angiogenezis gátló hatást közvetítenek. Például troglitazon (TGZ) kezelést követően csökken a VEGF-C mRNS expresszió, ami érképzés gátló hatást feltételez, míg a 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) gátolja az endotelsejtek proliferációját in vitro és a VEGF indukált angiogenezist in vivo [62]. Humán endometrium sejteken egy másik PPARgamma

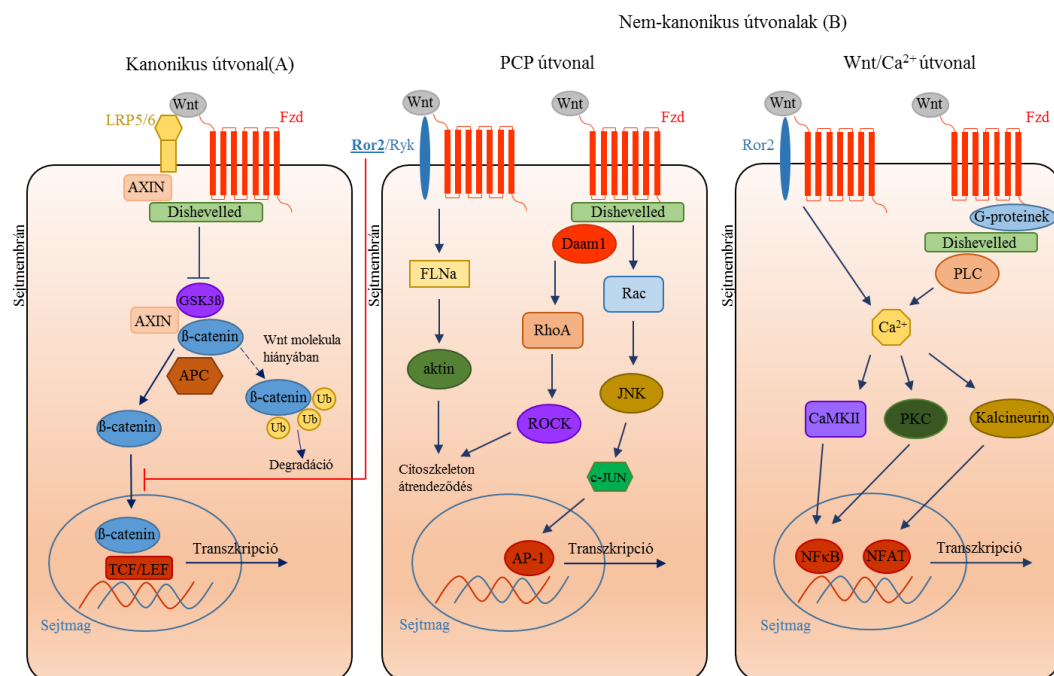
agonista kezelés, a roziglitazon (RSG) szintén VEGF expressziót gátol [63]. Érdekes módon szívből izolált myofibroblasztok esetében a fent említett ligandok ellenkező hatást váltottak ki, azaz VEGF expressziót indukáltak [64]. Az említett eredmények függvényében elképzelhető, hogy a PPARgamma általi VEGF szabályozás szövettípusonként eltérő lehet.

1.4 Wnt jelátvitel

1.4.1 Kanonikus és nem-kanonikus jelátvitel

A Wnt fehérjék egy evolúciósan konzervált molekulacsalád tagjai, melyek legalább három útvonalon és igen bonyolult jelátviteli folyamatokon keresztül szabályozhatják a sejtek osztódási képességét, polaritását vagy akár a migrációját. A Wnt molekulák szekretált glikoproteinek, a célsejt membránjában elhelyezkedő Frizzled (FZD) receptorokhoz kapcsolódnak, melyekből jelenleg 10 típus ismert. Az eddig leírt 19 Wnt molekula az említett 10 receptoron keresztül különböző jelátviteli útvonalakat indíthatnak el [65]. A ligand-receptor kötődést követően az LRP5/6 ko-receptorral stabil receptor komplex képződik és a jelátvitel az úgynevezett kanonikus útvonalon keresztül valósul meg. Ennek következtében a szabad, citoszolikus beta-katenin a sejtmagba kerül át és a TCF/LEF transzkripció faktor család tagjaival kapcsolódva génátíródást aktivál. Wnt-Fzd kötődés hiányában a beta-katenin APC-Axin-GSK3beta komplex által treonin-szerin aminosavakon foszforilálódik és proteaszómás degradáció eredményeképpen lebomlik [66]. A nem-kanonikus útvonal esetében a jelátvitelben nem játszik szerepet a fent említett beta-katenin, hanem ebben az esetben a kalmodulin kináz II-n és protein kináz C-n keresztül aktiválódó Wnt/Ca²⁺ jelátviteli útvonalról, vagy Jun N-terminális kináz által aktivált PCP útvonalról beszélhetünk [67].

A Wnt jelátvitel számos funkcióval rendelkezik. A Wnt-ok fontos szerepet töltenek be az őssejtek fenntartásában, a gasztrointesztinális, valamint a keringési rendszer kialakulásában, a csontvelő fejlődésében, vagy akár az öregedésben [68]. Ugyanakkor a karcinogenezisben betöltött szerepe is egyre jobban körvonalazódik, aktivációja növeli a tumor kialakulásának a lehetőségét egyes egérmodellekben [69]. A Wnt jelátvitel, mint onkogenikus folyamat már a tüdődaganatok kialakulásában is igazolt, Pacheco-Pinedo és munkatársai kimutatták, hogy a tüdőtumorokra jellemző Kras mutációt hordozó egértörzsekben a Wnt expresszió magas és aktiválódása együtt jár a megnövekedett tumorképződés valószínűségével [70].



5. ábra: A Wnt jelátvitel útvonalak és főbb komponenseinek összefoglalása.

Számos Wnt jelátviteli komponens vizsgálata kimutatta, hogy a tüdőben előforduló daganatok esetében, azon belül is a nem kissejtes tüdőrák altípus gyakran együtt jár valamely Wnt molekula megnövekedett mennyiségével, vagy a jelátviteli útvonal valamely inhibitorának lecsökkenésével. Nem kissejtes tüdőrákokban megfigyelték a Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt5a, Wnt11, beta-katenin, Frizzled-B túlzott expresszióját, ezzel szemben a Wnt jelátviteli út negatív szabályozójaként funkcionáló Axin, GSK3beta, avagy antagonistaként számon tartott Dkk-1 és NKD1 csökkent fehérje vagy mRNS szintjét [66]. Azonban az emelkedett Wnt szintek eltérő mintázatot mutathatnak a nem

kissejtes tüdőrák altípusain belül is. AC minták esetében a Wnt7b található nagyobb mennyiségben, míg az SCC alcsoportba tartozó esetekben a Wnt5a expressziója emelkedett. Azonban a Wnt11 mindkét csoportban szignifikánsan magasabb a kontroll csoporthoz képest. Feltételezve, hogy az egyes Wnt molekulák kombinációja is fontos moduláló szerepet tölt be a karcinómák kialakulásában, a Wnt5a/Wnt11 az SCC míg a Wnt7b/Wnt11 pedig az AC esetében lehet fontos kombináció [71].

Lipid tulajdonságaik miatt erősen hidrofób molekulák, transzportjuk közvetlenül testfolyadékba való szekréció útján valószínűtlen. Az extracelluláris molekulákkal történő transzport régóta leírt módja a sejtek közti kommunikációnak, a Wnt molekulák hosszabb távra való eljutását is ezek a lipid vezikulák segítik [72]. Az említett mechanizmusban fontos szerepet játszó Reggie-1/flotillin-2 molekula szabályozza a szolubilis, mobilizálható Wnt molekulák felhalmozódását, amely a hosszú-távú transzport alapfeltétele [72]. A flotillin-2 molekulát már összefüggésbe hozták nem kissejtes tüdőrákok progressziójával is [73]. A Wnt molekulák kombinációjának jelentősége mellett a gradiens jellegű eloszlásuk és lokális koncentrációjuk is módosíthatja az adott szöveti környezetben jelenlévő Wnt molekulák hatásmechanizmusát.

1.4.2 Wnt5a szerepe az angiogenezisben

A Wnt5a molekulát a nem-kanonikus Wnt jelátviteli út egyik komponenseként írták le, mely elsősorban a Wnt jelátvitel egyik kulcsmolekulájaként számon tartott Dishevelled molekulák közül a Dvl-3 molekulán keresztül aktiválódik és Ca^{2+} útvonalon keresztül fejti ki hatását. Fzd3/Fzd6 receptorokhoz való kötődése során aktiválhatja a harmadik útvonalként említett PCP útvonalat, melyet főként az emésztőrendszert érintő rákokban írtak le [74]. A Wnt5a különböző útvonalon keresztüli jelátvitele az érképződés során is ismert. Yang és munkatársai kimutatták, hogy a Wnt5a képes az egér embrionális őssejtjeiben indukálni az endotél differenciálódást beta-katenin és PKCalfa függő útvonalon keresztül is [75]. A Wnt5a expressziója kimutatható több egér szervben az érrendszer fejlődése során, úgy, mint a bőr, máj, gyomor, vagy a méh különféle szöveti területein [76]. Számos irodalmi hivatkozásból ismert, hogy a Wnt5a és egyes Frizzled receptorok megtalálhatóak primer endotélsejteken is [77] [78]. A Wnt5a továbbá serkenti az endotélsejtek osztódását, túlélését és migrációját is. Nem meglepő tehát,

hogy a Wnt jelátvitel -számos egyéb funkciója mellett- az angiogenezis szabályozásában is közreműködik [79].

Szerepe ugyanakkor nem csak a fiziológias angiogenezisben van. A Wnt5a által indukált jelátvitel alul- vagy túlműködése kóros érképződéssel járhat. Vastagbél neopláziában a kanonikus Wnt útvonal VEGF szintézist indukál, ami megnövekedett angiogenezishez vezet [80]. Ugyanakkor Ekström és munkatársai leírták, hogy melanoma sejtekben a Wnt5a egyes pro-angiogenikus faktorok (IL-6, IL-8, VEGF és MMP2) exoszómákból történő felszabadulását serkentette, míg azok mRNS szintje változatlan maradt [81]. Yao munkacsoportja viszont a Wnt5a túlzott expresszióján keresztül történő angiogenezis indukációjáról számolt be nem kissejtes tüdőrákokban [82]. A Wnt5a overexpresszió együtt jár továbbá a stróma VEGF-A expressziójával, ami a tumor agresszivitásának megnövekedését és kedvezőtlen prognózist von maga után, különösen SCC esetében [83]. Ezért nem meglepő módon a fenti eredményekre hivatkozva vetették fel korábban, hogy a bevacizumab kezelés megoldást jelenthet a Wnt5a pozitív nem kissejtes tüdőrák altípusokban. A későbbi eredmények azonban ellentmondóak voltak, hiszen az angiogenezist célzó anti-VEGF terápia SCC esetén súlyos mellékhatások kialakulásához vezetett [22]. Mindezen eredmények együttese sugallja azt a feltevést, hogy a Wnt molekulák és az általuk szabályozott folyamatok eltérőek lehetnek az egyes tumortípusokon belül is. Míg az AC altípusban emelkedett Wnt7b molekulának az angiogenezisben betöltött szerepéről nincs irodalmi adat, addig az SCC daganatokra jellemző Wnt5a és az angiogenezis közti párhuzam még nem bizonyított.

A fent említett folyamatok további vizsgálata jelentős szerepet tölthet be a tumor érhalózat kialakulásának alaposabb megismerésében és a megbízhatóbb terápiás kombinációk kialakításában.

2. Célkitűzések

Kutatócsoportunk korábbi munkái igazolták, hogy a tüdőszövet öregedése során a kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulák megváltozott egyensúlya a struktúra és a funkció csökkenéséhez vezet [51]. A Wnt jelátviteli útvonal által szabályozott PPARgamma molekula felelős a surfactant fehérje mennyiségének csökkenéséért és a regenerációs kapacitás romlásáért, amely közre játszhat a tüődaganatok kialakulásában.

Kutatómunkám során ezért a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1. Az érképzés folyamatában kiemelkedő szerepet játszó VEGF-A molekula megjelenése miként változik öregedés során és a különböző tüődaganatokban, továbbá milyen szerepet játszik a megváltozott érhalózat kialakulásában?*
- 2. Befolyásolja-e a kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulák hatására megváltozott mikrokörnyezet a PPARgamma expressziót? Amennyiben igen, milyen molekulák állhatnak az eltérő szabályozás hátterében?*
- 3. A vizsgált Wnt molekulák milyen hatással vannak az endotélsejtek élettani folyamataira és szerepet játszanak-e a tüdő érhalózatának alakulásában nem kissejtes tüdőrákban AC és SCC altípusainak esetében?*

3. Anyagok és módszerek

3.1 Etikai engedély

A humán tudominták a Pécsi Tudományegyetem Sebészeti Osztályáról származnak, az egyetemi Etikai Bizottság jóváhagyásával gyűjtve. A betegektől származó minták minden esetben a beteg jóváhagyását követően, anonim mintaként kerültek laboratóriumi feldolgozásra.

Hisztológia	AC (n=23)	SCC (n=16)
Nem (n)		
Nő	10	4
Férfi	13	12
Életkor (év)		
Medián	59	59,5
Tartomány	41-73	54-77
TNM státusz		
T1N0	4	2
T1N1	-	1
T1N2	3	1
T2N0	4	8
T2N1	5	1
T2N2	2	2
T3N0	1	-
T3N1	1	2
T3N2	3	-
T4N0	-	1

1. táblázat: A kísérletben felhasznált betegmintákhoz tartozó adatok és hisztológiai osztályozásuk.

3.2 Primer sejtek és sejtvonalak

A 3 dimenziós in vitro tüdőmodell összeállításához különböző donoroktól származó (Lonza, Basel, Svájc) primer, normál sejteket használtunk. VEGF-A overexpresszáló sejtvonallétrehozásához immortalizált humán fibroszblaszt (F11-hTERT) sejtvonalat alkalmaztunk. LiCl hatásának bizonyításához A549 humán AC sejtvonallal végeztük a kísérleteket.

SAEC (small airway epithelial cell)	normál, primer kislégúti epitélisejt
NHLF (normal human lung fibroblast)	normál tüdő fibroblaszt sejt
HMVEC-L (human microvascular endothelial cell)	normál mikrovaszkuláris endotélisejt

2. táblázat: A felhasznált primer sejtek eredete.

A sejtek fenntartásához a forgalmazó által javasolt tenyésztő médiumot használtuk és standard sejtenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO₂) tenyésztettük. A primer sejtek tenyésztéséhez alkalmazott médium összetételét a 3. táblázat foglalja össze. Az A549 sejtvonal felsokszorozásához és tenyésztéséhez 10% borjú szérummal (FBS), 200mM L-glutaminnal, illetve penicillin -sztreptomycin oldattal kiegészített DMEM alapmédiumot használtunk.

<i>Sejttípus</i>	SAEC	NHLF	HMVEC-L
Médium	<p><i>SAGM tenyésztő médium:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - SABM Basal medium - BPE (Szarvasmarha agyalapi mirigy kivonat) - Hidrokortizon - Epinefrin - Transzferrin - Retinsav - Inzulin - Trijódtironin - Gentamicin - Szarvasmarha szérum albumin (BSA) 	<p><i>FGM-2 tenyésztő médium:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - FBM alapmédium - FBS - Humán fibroblaszt növekedési faktor - Inzulin - Gentamicin 	<p><i>EGM-2 MV tenyésztő médium:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - EBM alapmédium - FBS - Epidermális növekedési faktor - Hidrokortizon - Humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktor - Humán fibroblaszt növekedési faktor - Aszkorbinsav - Inzulin-szerű növekedési faktor 1 - Gentamicin

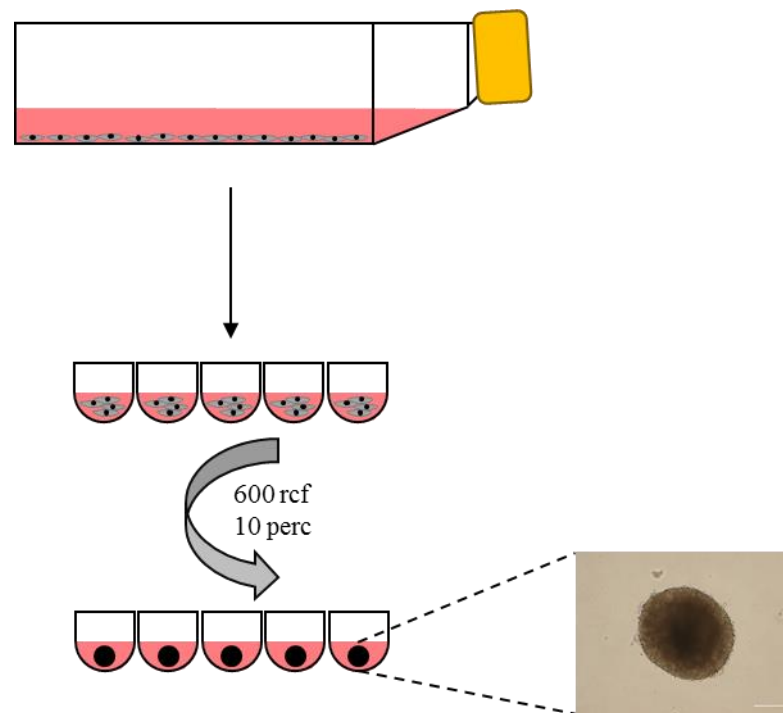
3. táblázat: A felhasznált primer sejtek tenyésztéséhez használt médiumok és összetevőik.

3.3 Kísérleti állatok

A kísérletek során konvencionális körülmények között tartott C57BL/6 és PPARgamma knock-out egértörzset használtunk, mindkét nemből. Az állatok 3 és fél hónapos korukban lettek feláldozva. A dolgozatban felhasznált kísérleti állatok Prof Nagy László (Debreceni Egyetem) kutatócsoportjában készültek.

3.4 3 dimenziós (3D) tüdőmodell [51](Szabadalom: P0900819)

A normál primer sejteket az előzőekben leírt módon tenyésztettük, majd miután a 80%-os konfluenciát elérték, tripszines emésztés segítségével sejtszuszpenziót készítettünk mindhárom sejttípusból. Ezt követően meghatározott arányban (30% SAEC, 30% HMVEC-L, 40% NHLF vagy 40% F11) összekevert sejtszuszpenziót nem kitapadó sejtekre kialakított, U-aljú 96-lyukú lemezre mértük és 10 percig centrifugáltuk 600g-n. A szferoidokat a kezeléseket megelőzően egy éjszakán át standard sejtenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO₂) tartottuk. Ezután a kezelésekek előtt a kompakt szferoidokat 96-lyukú lemezről 20 mg/ml poly-HEMA bevonattal ellátott 24-lyukú lemezre tettük át és a kísérlet végéig termosztátban tartottuk.



6. ábra: 3D in vitro tüdőaggregátum készítésének sematikus összefoglalása.

3.5 VEGF-A rekombináns lentivirális konstrukció létrehozása és hF11 sejtvonal transzfektálása

Humán VEGF-A 165 izoforma amplifikálása a következő primerekkel történt: forward 5'- GGA TTC CTG ACG GAC AGA CAG ACA GAC-3' és reverz 5'- GTC GAC

TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA-3', majd Lenti pWPTS vektorba klónoztuk. Lentivirális vektor készítése az alábbi publikációban leírtak szerint történt [84].

VEGF-A fibroblaszt sejtekbe történő transzfektálását a fent leírt konstrukciókkal végeztük. A sejteket FGM-2 médiumban tenyésztettük, majd 1 órán át a lentivirális konstrukciókat tartalmazó médiummal inkubáltuk és PBS mosást követően FGM-2 médiumban tenyésztettük. VEGF-A overexpresszáló F11 sejteket (továbbiakban VEGF-A^{magas}) összegyűjtöttük, majd a fent leírt protokoll szerint aggregátumokat készítettünk. SAEC-F11 VEGF-A^{magas}- HMVEC-L és SAEC-F11-HMVEC-L aggregátumokat további 72 órán át inkubáltuk RNS izolálás vagy immunfluoreszcens festés előtt. Wnt5a és Wnt11 kezelés esetén a rekombináns fehérjéket 1 µg/ml-es koncentrációban adtuk a médiumhoz.

3.6 Rekombináns fehérjék és egyéb kezeléshez használt anyagok

A sejtvonalak kezelésére használt IWR-1 molekulát (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a kanonikus Wnt jelátviteli útvonal gátlására használtuk és 1 µM-os koncentrációban alkalmaztuk. Az IWR-1 inhibitor az Axin fehérjekomplex stabilizálásán keresztül fokozza a beta-katenin lebontását, így gátolva a kanonikus jelátvitelt [85]. A kanonikus útvonal aktiválására használt LiCl a GSK-3beta gátlásán keresztül hat [86]. 10 mM-os törzsoldatát 100 µM-os hígításban adtuk a sejtekhez. A szferoidok kezelésére tisztított, rekombináns Wnt5a (R&D Systems, Minneapolis, USA) molekulát használtunk 1 µg/ml-es koncentrációban. PPARgamma specifikus agonistaként a RSG-t Sigma Aldrich, St. Louis, USA), antagonistaként a GW9662-t (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) használtuk 10-10 µM-os koncentrációban.

3.7 RNS izolálás, cDNS készítés

A humán tüdőszövetekből Trizol Reagenssel ((Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) totál RNS-t izoláltunk. A szövetet PBS-ben mostuk, szikével darabokra vágtuk, majd Trizol reagensbe felvettük. 20 perc 12000 rpm-en történő centrifugálást követően az RNS tartalmú fázist leszívtuk és izopropanolra mértük rá. Ismételt centrifugálás után a keletkezett üledéket mostuk, majd RNáz-mentes vízben visszaoldottuk. Az izolált RNS minta koncentrációját és minőségét NanoDrop készülékkel mértük. A mérést követően 1 µg totál RNS-t tartalmazó mintán DNáz kezelést (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) alkalmaztunk és cDNS-t készítettünk. A DNáz kezeléshez 1 µl DNáz enzimet (1 unit/µl) az kitben lévő emésztőpufferben

oldottuk, 10 percig hőkezeltük (25°C), majd 0,5 µl 50 mM EDTA tartalmú stoppoló oldattal, majd további 10 perces 70°C-os hőkezeléssel állítottuk le a reakciót. Az ilyen módon előkészített RNS mintából cDNS-t készítettük a gyártó által javasolt protokoll szerint (HighCapacity cDNA kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Hagyományos mono-, illetve ko-kultúrák és 3D szövetek esetében NucleoSpin RNA isolation kit-et (Macherey-Nagel, Düren, Germany) használtunk RNS izolálás céljából. A koncentrációmérést követően 1µg mennyiségű totál RNS-t felhasználva cDNS-t készítettünk a fent említett protokoll alapján.

3.8 Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)

Az elkészített cDNS mintákból valós idejű génexpressziót vizsgáltunk qPCR segítségével. A kísérlet során HighROX SensiFast SYBR Green Master Mixet (BioLine, London, UK) használtunk, az amplifikációt pedig ABI StepOnePlus készüléken futtattuk. A PCR kondíciók a következők voltak: 95°C 2 perc, 40 cikluson keresztül 95°C 5 másodperc és 60°C 30 másodperc. A kapott eredményeket StepOne szoftverrel analizáltuk és beta-aktin belső kontrollhoz normalizáltuk. A génexpresszió változások kiszámítására $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert alkalmaztunk, az alábbi képlet alapján: $Ct(\text{célgén}) - Ct(\text{belső kontroll gén})$. A génexpresszió relatív kvantifikációját pedig a következő formula alapján számítottuk ki: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, ahol a $\Delta\Delta Ct$ a következő egyenlethől származik: $\Delta Ct(\text{kezelt minta}) - \Delta Ct(\text{kontroll minta})$. A PCR reakciók során használt specifikus oligonukleotidokat a 4. táblázat foglalja össze.

Célgén	Forward primer	Reverz primer
beta-aktin	GCGCGGCTACAGCTTCA	CTTAATGTCACGCACGATTTCC
E-kadherin	GACCGGTGCAATCTTCAAA	TTGACGCCGAGAGCTACAC
N-kadherin	AGCTTCTCACGGCATAACACC	GTGCATGAAGGACAGCCTCT
VE-kadherin	ATGAGATCGTGGTGAAGCG	GGTGTCTTCAGGCACGACAA
VEGF-A	GGGCAGAATCATCACGAAGT	TGGTGATGTTGGACTCCTCA
HIF-1alfa	GCCAGACGATCATGCAGCTA	ATCCATTGATTGCCCCAGCA
IL-1beta	TCAGCCAATCTTCATTGCTCAA	TGGCGAGCTCAGGTACTIONCTG
PPARgamma	GCTTTTGGCATACTCTGTGATCTC	GGTGGCCATCCGCATCT
Wnt5a	CAAAGCAACTCCTGGGCTTA	CCTGCTCCTGACCGTCC
CD31	GCTGACCCTTCTGCTCTGTT	ATCTGGTGCTGAGGCTTGAC
CD105	CTCTCCAGGCATCCAAGCAA	CAGGCTGGAATTGTAGGCCA

4. táblázat: A felhasznált oligonukleotidok szekvenciái.

3.9 Taqman array plate

AC és SCC mintákban a Wnt jelátviteli molekulák mRNS szintű vizsgálatához 92 gént és 4 belső kontroll gént tartalmazó Wnt lemezt használtunk (Taqman array, Human Wnt pathway, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A cDNS:Taqman Universal PCR Master Mix (2x) elegyet szétosztottuk (20 µl/reakció). A vizsgálatot ABI StepOnePlus rendszerrel és hozzá tartozó StepOne szoftverrel végeztük. A futtatási reakció a következő kondíciók szerint zajlott: 50°C 2 perc, 95°C 10 perc, 40 ciklus 95°C 15 másodpercig és 60°C 60 másodpercig.

3.10 TaqMan microRNA assay

MikroRNS vizsgálatához ABI TaqMan microRNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) segítségével 100 ng RNS felhasználásával reverz transzkripciót állítottunk össze. Minden reakció specifikus miR-27b, miR200b és U6 primereket tartalmazott. A PCR reakcióhoz TaqMan MicroRNA Assay (20x)-t, TaqMan Universal Master Mix (2x)-et és a reverz transzkripcióból származó végterméket adtunk. A vizsgálatot ABI StepOnePlus rendszerrel és hozzá tartozó StepOne szoftverrel végeztük. A futtatási reakció a következő kondíciók szerint zajlott: 95°C 10 perc, 40 ciklus 95°C-on 15 másodpercig és 60°C 60 másodpercig. MiR-27b és miR-200b expresszióját U6-hoz normalizálva számítottuk ki.

3.11 Beágyazás és metszetkészítés

Mind a humán, mind pedig az egérmodellből származó tüdőszöveteket a műtétet követően 1% FBS tartalmú PBS-ben tároltuk a felhasználásig. Metszésre történő beágyazásához a szövetekből 0,5 x 0,5 cm-es darabot PBS: beágyazó médium 1:1 arányú keverékével feltöltöttük és beágyazó médiumot (TissueTek embedding media, Alphen aan den Rijn, Netherland) tartalmazó metszettartó kazettába tettük, majd a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3D tüdőszövetek esetében a szferoidokat szintén beágyazó médiumot tartalmazó metszettartó kazettába tettük és a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Immunfluoreszcens festés céljából 8 µm vastagságú metszetek kriosztáttal készítettük (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany) és 10 percig hideg acetonban fixáltuk.

3.12 Immunfluoreszcens festés

A fixálás után a metszeteket 20 percig rehidratáltuk és blokkoltuk 5% BSA tartalmú PBS oldattal. Ezt követően az egér tüdőmetszeteket anti-egér Wnt5a és direkten jelölt anti-CD31, anti-CD105 elsődleges antitesttel jelöltük 1 órán át. Humán metszetek és 3D szövetmodellek esetén humán anti-VEGF-A és anti-CD31 elsődleges antitestet alkalmaztunk. A nem direkten jelölt antitestekhez háromszori PBS oldatos mosást követően AlexaFluor 488 és 555 konjugált anti-egér, illetve anti-patkány IgG másodlagos antitestet tettünk. A sejtmagokat minden esetben TO-PRO3 festékkel jelöltük. A metszeteket a másodlagos antitesttel való inkubálás után is háromszor PBS oldattal mostuk, majd Vectashield fedőoldattal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük. A képeket konfokális mikroszkóppal készítettük (Zeiss LSM 710), a fluoreszcens képek szerkesztését és a festések intenzitás mérését Fiji képszerkesztő programmal végeztük [87]. Az ábrákon szereplő képek minden esetben legalább három független kísérletből kiválasztott reprezentatív ábrák. Az intenzitás mérések három, vagy esetenként több mérésből származó értékek átlagaiból származnak.

Elsődleges antitestek	Hígítás	Gyártó
Alexa Fluor 488 anti-egér CD105	1:100	BioLegend (Klón: MJ7/18)
Alexa Fluor 594 anti-egér CD31	1:100	BioLegend (Klón: MEC13.3)
Patkány anti-egér Wnt5a	1:50	R&D Systems (Klón: 442625)
Egér anti-humán CD31	1:50	BioLegend (Klón: WM59)
Egér anti-humán VEGF-A	1:100	R&D Systems (Klón: 26503)
Másodlagos antitestek	Hígítás	Gyártó
Alexa Fluor 488 anti-egér IgG	1:200	Life Technologies
Alexa Fluor 555 anti-egér IgG	1:200	Life Technologies

5. táblázat: Immunfluoreszcens festések során alkalmazott antitestek és hígításaik.

3.13 Hematoxin-eozin festés

A 8 µm vastag tüdőmetszeteket és a függesztett sejtenyésztő betéteket Mayer's hematoxin oldatban (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) festettük 10 percig. A mintákat ezt követően folyó vízben 10 percig mostuk, majd 0,25%-os ecetsavval differenciáltattuk 1 percig. Ezután desztillált vízzel mostuk, majd 2 percig eozin oldattal

festettük. A mosást követően Vectashield fedőoldattal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük és Nikon Eclipse Ti-U inverz mikroszkóppal fotóztuk.

3.14 PPRE riporter assay

A549 sejteket PPAR kötőhelyet tartalmazó PPRE és egy kontrollként használható, nem funkcionális PPRE résszel rendelkező plazmiddal transzfektáltunk. PPAR molekula kötődése következtében a plazmidban található luciferáz gén aktiválódik, a BrightGlo (Promega, Madison, USA) reagensben található luciferin szubsztrátot ATP jelenlétében lumineszcens jelet eredményező oxyluciferinné alakítja. 96-lyukú lemezen $6 \cdot 10^3$ -on sejthez 100 ng plazmid DNS-t vittünk be. A transzfektáláshoz reakciónként 0,3 μ l Lipofectamine 3000 reagenst (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) és 0,5 μ l P3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) reagenst használtunk. Egy éjszakán át történő inkubálást követően a transzfektált sejtek 24 órás 10mM LiCl és 1 μ M IWR-1 kezelésnek vetettük alá. PPAR aktiváció méréséhez BrightGlo luciferáz assay-t (Promega, Madison, USA) alkalmaztunk, melyet Synergy HT (BioTek) olvasóval detektáltunk. Az aktivációban bekövetkező változásokat PPRE kontroll plazmiddal transzfektált sejtekhez hasonlítottuk. A fent említett sikeres transzfektálás és 24 órás kezelés után RNS-t izoláltunk, cDNS-t írtunk és real-time PCR-rel analizáltuk. A géneexpresszióban történő változást nem kezelt kontroll sejtekhez viszonyítottuk. A fehérje termelésében bekövetkező változások követésére a transzfektált sejteken 72 órás LiCl (10mM) és IWR-1 (1 μ m) kezelést alkalmaztunk. A kezelés befejezését követően a fehérje transzport megállítására Brefeldin-A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 10 μ g/ml-es koncentrációjú oldatával kezeltük 4 órán át, mivel a VEGF-A szolubilis faktor. A VEGF-A molekulát tisztított VEGF-A antitesttel és AlexaFluor 488 konjugátummal kapcsolt anti-egér másodlagos IgG-vel vizualizáltuk immunfluoreszcens jelölés során. A sejtmagokat TO-PRO3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) festékkel jelöltük és kék színben jelenítettük meg. A másodlagos antitesttel való inkubálást háromszori PBS oldattal történő mosás követte, majd a lemezeket Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedőoldattal fedtük. A képek Zeiss LSM 710 típusú konfokális mikroszkóppal készültek és három független kísérletből reprezentatív ábra került megjelenítésre.

3.15 PPAR γ agonista és antagonistá kezelés

F11 fibroblaszt sejteket 24- lyukú lemezen tenyésztettük és 10 μ M RSG-vel (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) és 10 μ M GW9662-vel (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) kezeltük 48 órán át 1 μ g/ml rekombináns humán Wnt5a jelenlétében vagy hiányában. VEGF-A mRNS szintet SYBR Green alapú kvantitatív PCR segítségével határoztuk meg, a miR-27b expressziós szintjét Taqman MicroRNS kittel végeztük.

3.16 HMVEC-L migrációs kísérlet

HMVEC-L endotélsejteket $2 \cdot 10^4$ sűrűségben függesztett sejttenyésztő betét (8 μ m pórusátmérő, Corning, New York, USA) belső felén tenyésztettük. A 24-lyukú lemez sejttenyésztő felszínén VEGF-A túltermelő sejtet tenyésztettük. Kontrollként a normál VEGF-A fehérjét termelő sejtet használtuk. Wnt5a hatásának vizsgálatához a VEGF-A termelő sejtekhez rekombináns Wnt5a-t adtunk 1 μ g/ml-es koncentrációban. 24 óra elteltével a függesztett betéteket hematoxin-eozin festéssel tettük láthatóvá. A képeket Nikon Eclipse Ti-U inverz mikroszkóppal készítettük.

3.17 Áramlási citometriás mérés

A 3D tüdőmodellek elkészítését követően a szferoidokat (3D SAEC-F11 VEGF^{high}-HMVEC-L és SAEC-F11-HMVEC-L) egy éjszakán át inkubáltuk rekombináns humán Wnt5a fehérje jelenlétében vagy a nélkül. A kezelés lejárta után a 3D tüdőmodellekből AccumaxTM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oldat segítségével egysejt-szuszpenziót készítettünk. Natív AC és SCC minták esetében az enzimátikus emésztést szintén AccumaxTM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oldattal végeztük. Mindkét mintatípus esetében a sejteket 1 ml PBS-sel mostuk és 5 percig 1000 rpm-en centrifugáltuk. A 3D modellek felszíni jelöléséhez Brilliant Violet 421 konjugátummal kapcsolt anti- humán CD31 (Klón VM59, BioLegend, San Diego, USA) és allophycocyanin (APC) jelölt anti- humán CD105 antitesteket (Klón 43A3, BioLegend, San Diego, USA) 100 μ l PBS pufferben hígítva alkalmaztuk a mintákon. Natív minták esetén APC Cy7 konjugátummal jelölt anti- humán CD31 (Klón: VM59, BioLegend, San Diego, USA) és APC jelölt CD105 (Klón 43A3, BioLegend, San Diego, USA) antitestet alkalmaztunk szintén 100 μ l PBS pufferben hígítva. 30 perces, sötétben elvégzett inkubálást követően 1 ml PBS pufferrel mostuk és 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A mérést BD FACS DIVA V6 szoftverrel ellátott FACS Canto II áramlási citométerrel

mértük (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium), az analízist FCS Express V4 szoftverrel végeztük.

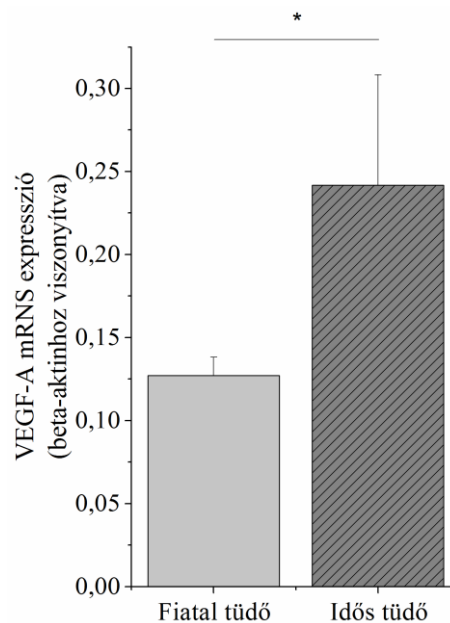
3.18 Statisztikai analízis

Az ábrázolt értékek minden esetben az átlag +/- standard hiba (SEM). A statisztikai elemzés SPSS 20 (IBM) szoftverrel történt, Student t-próba és egy-utas ANOVA (Bonferroni post hoc) tesztek segítségével. Minden esetben $p < 0.05$ értéket tekintettük szignifikáns eredménynek.

4. Eredmények

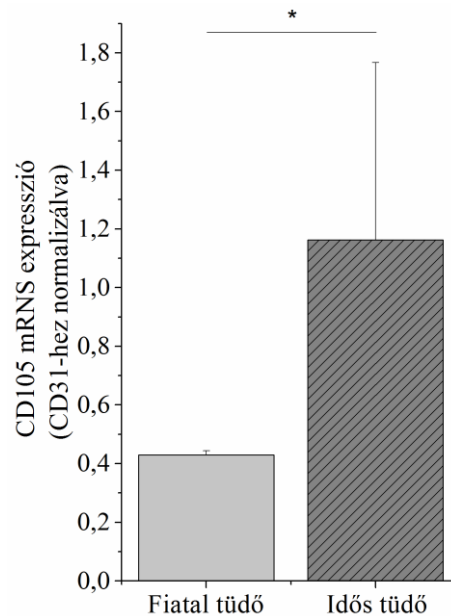
4.1 VEGF-A expresszió az öregedő tüdőben

Az érzékelés a kor előrehaladtával a VEGF-A mennyiségi csökkenésének következtében lassul [88]. Ugyanakkor, patkánykísérletekből származó adatok szerint, normoxiás körülmények között a fokozott apoptózis a tüdőben emelkedett VEGF-A expresszióhoz vezet [89]. Annak érdekében, hogy kiderítsük, az életkor növekedésével együtt járó VEGF-A emelkedés csak a patkányok esetében igaz-e, humán mintákban qPCR módszer segítségével mértük meg a VEGF-A szintet. A megvizsgált humán tüdőmintákat átlagolva, a VEGF-A szint szignifikánsan emelkedik az idősebb tüdőben (7. ábra).



7. ábra: VEGF-A expressziós szintje beta-aktin belső kontroll génhez viszonyítva, egészséges fiatal ($n=5$) és idős ($n=5$) emberből származó tüdőszöveti mintákból. Átlag \pm SEM, Student t -próba, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

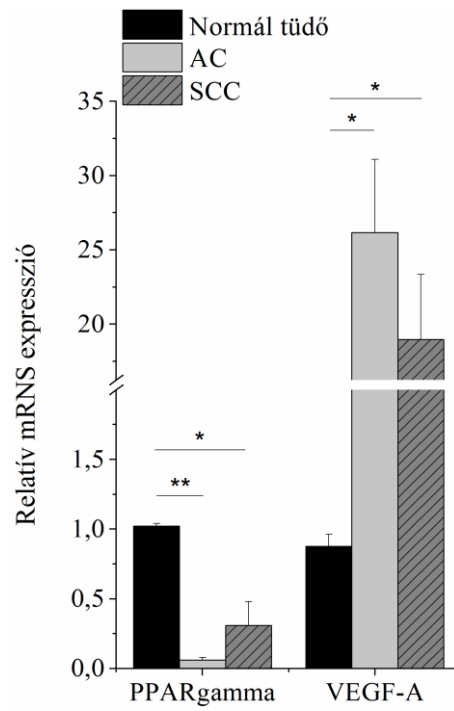
A fent említett tényező mellett további molekulákat kerestünk, amelyek az angiogenezis állapotáról adhatnak tájékoztatást. A CD105 az aktív proliferáció markere az endotélsejtek esetében. Ezért a fent megvizsgált humán mintákon qPCR segítségével néztük a CD105 marker kifejeződését mRNS szinten, mely az öregedő tüdőben tapasztalt VEGF-A változásához hasonlóan emelkedett szintet mutatott (8. ábra).



8. ábra: CD105 expressziós szintje egészséges fiatal ($n=5$) és idős ($n=5$) emberből származó tüdőszöveti mintákból. CD105 mRNS expressziós szintje az általánosan használt CD31 endotélmarkerhez viszonyítva. Átlag \pm SEM, Student t -próba, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

4.2 PPARgamma és VEGF-A génexpresszió humán AC és SCC mintákból

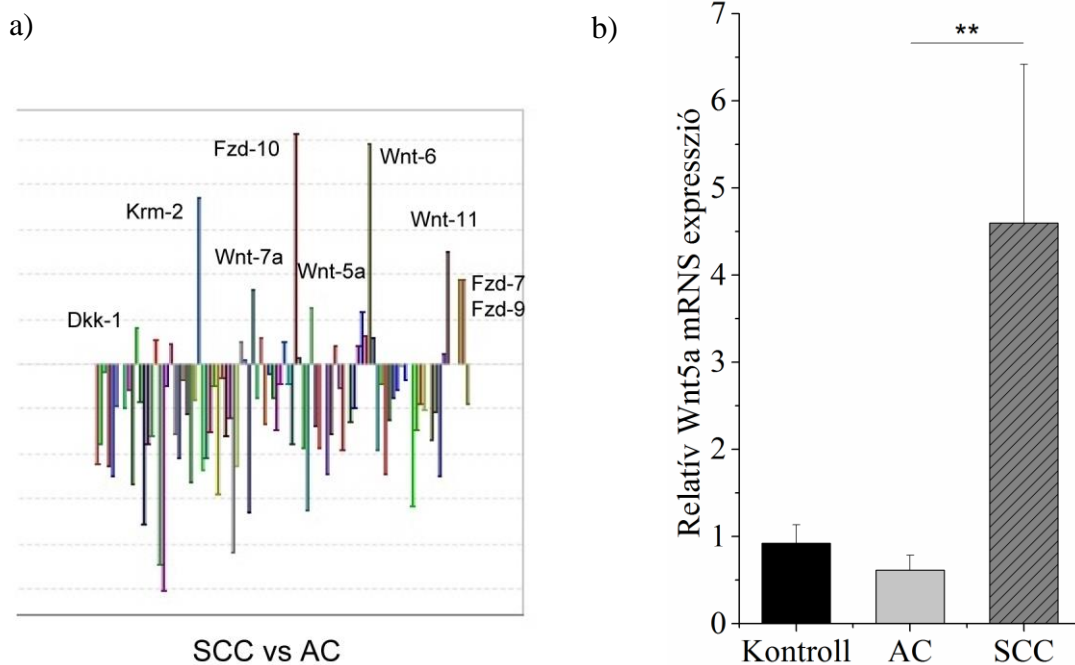
Az egészséges fiatal és idős tüdőmintákat követően humán nem kissejtes tüdőtumor minták, azon belül AC és SCC minták esetében is megvizsgáltuk az angiogén faktorok kifejeződését. A VEGF-A molekula mRNS szintje mindkét tumortípus esetében szignifikánsan magasabb, a PPARgamma pedig szignifikánsan alacsonyabb a normál, egészséges tüdőhöz képest (9. ábra). A két altípus összehasonlító analízise során tapasztalt megfigyelések még inkább hangsúlyozták egy eltérő szabályozási mechanizmus meglétét. Alacsonyabb PPARgamma szint ugyanis magasabb VEGF-A expresszióval párosul AC mintákban, míg SCC esetében a mintázat ellentétesen alakul, magasabb PPARgamma szint alacsonyabb VEGF-A jelenléthez vezet mRNS szinten.



9. ábra: PPARgamma és VEGF-A génexpresszió vizsgálata AC (n=11) és SCC (n=12) betegekből származó mintákban, normál tüdőszövethez hasonlítva. Átlag ± SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

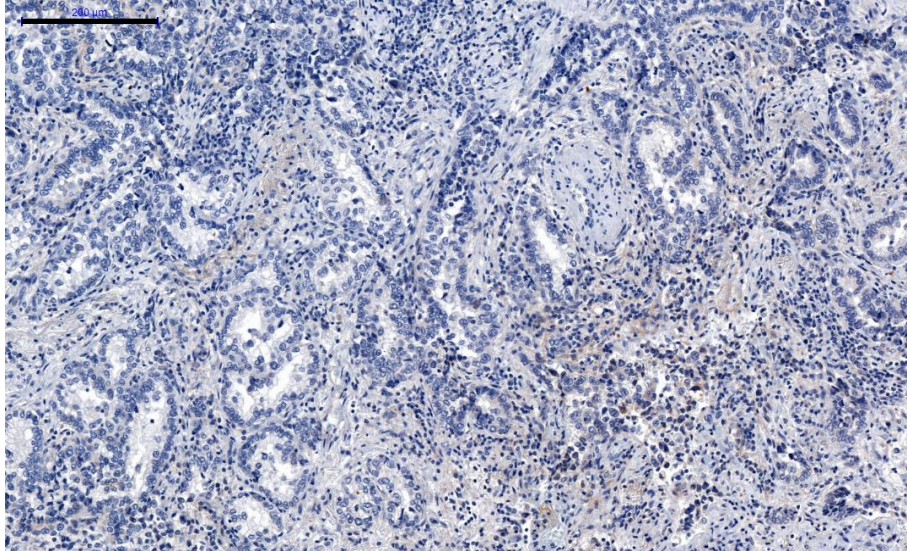
4.3 Wnt jelátviteli molekulák a primer nem kissejtes tüdőkarcinómákban

A fenti eredmények alapján arra következtettünk, hogy a PPARgamma a tüdőben lejátszódó angiogenezis egyik szabályozó molekulája lehet. Munkacsoportunk előző kutatásaiból tudjuk, hogy az öregedés során beta-katenin útvonalon keresztül csökken a PPARgamma mRNS és fehérje mennyisége [51]. Így megvizsgáltuk a Wnt jelátviteli molekulák expresszióját AC és SCC betegmintákon. A primer tumor analízisünk során kimutattuk, hogy a Wnt5a szignifikánsan magasabb szinten van jelen SCC mintákban, mint az AC betegekben (10. és 11. ábra).

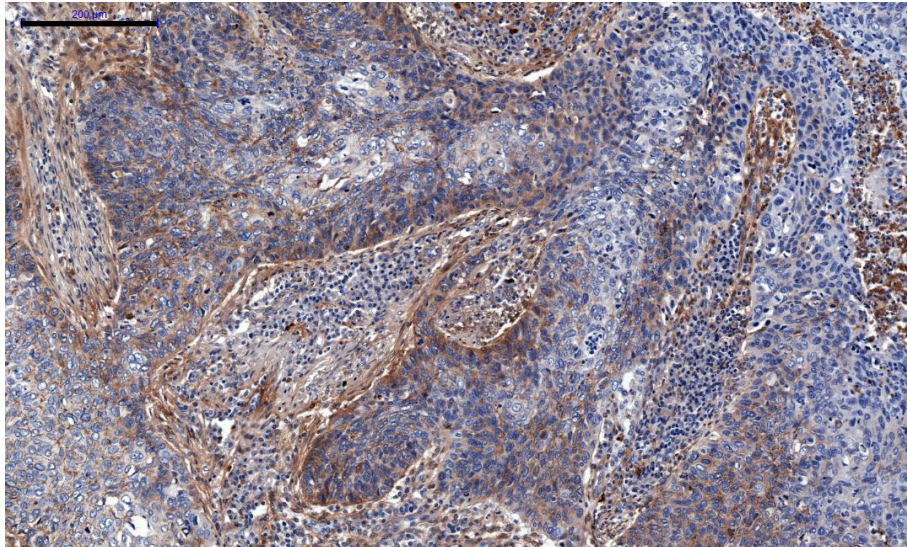


10. ábra: a) Wnt mRNS expresszió AC (n=12) és SCC (n=8) mintákban, előre összeállított Taqman lemezen. b) Wnt5a mRNS expresszió szintje AC (n=11) és SCC (n=12) mintákban normál tüdőszövethez viszonyítva. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

AC



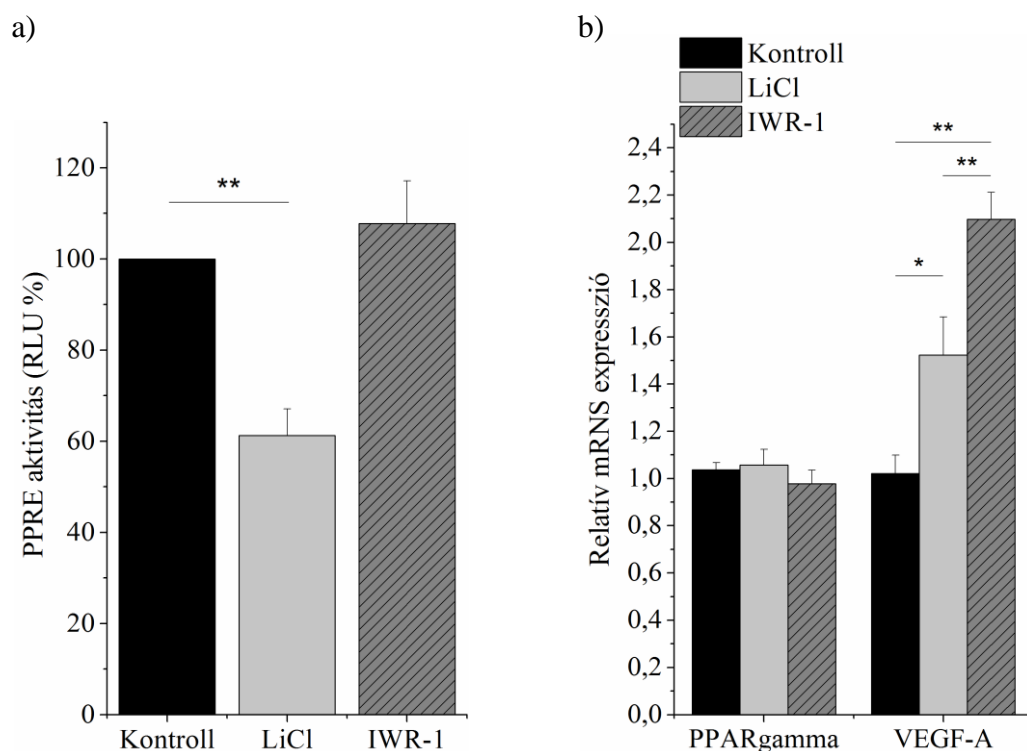
SCC



11. ábra: Wnt5a fehérje immunhisztokémia festéssel kimutatva AC és SCC metszeteken. A képek 5 különböző betegmintából kiválasztott reprezentatív képek. 10x-es nagyítás, lépték 200 μm.

4.4 A kanonikus Wnt jelátviteli útvonal szerepe a PPARgamma aktivációjában

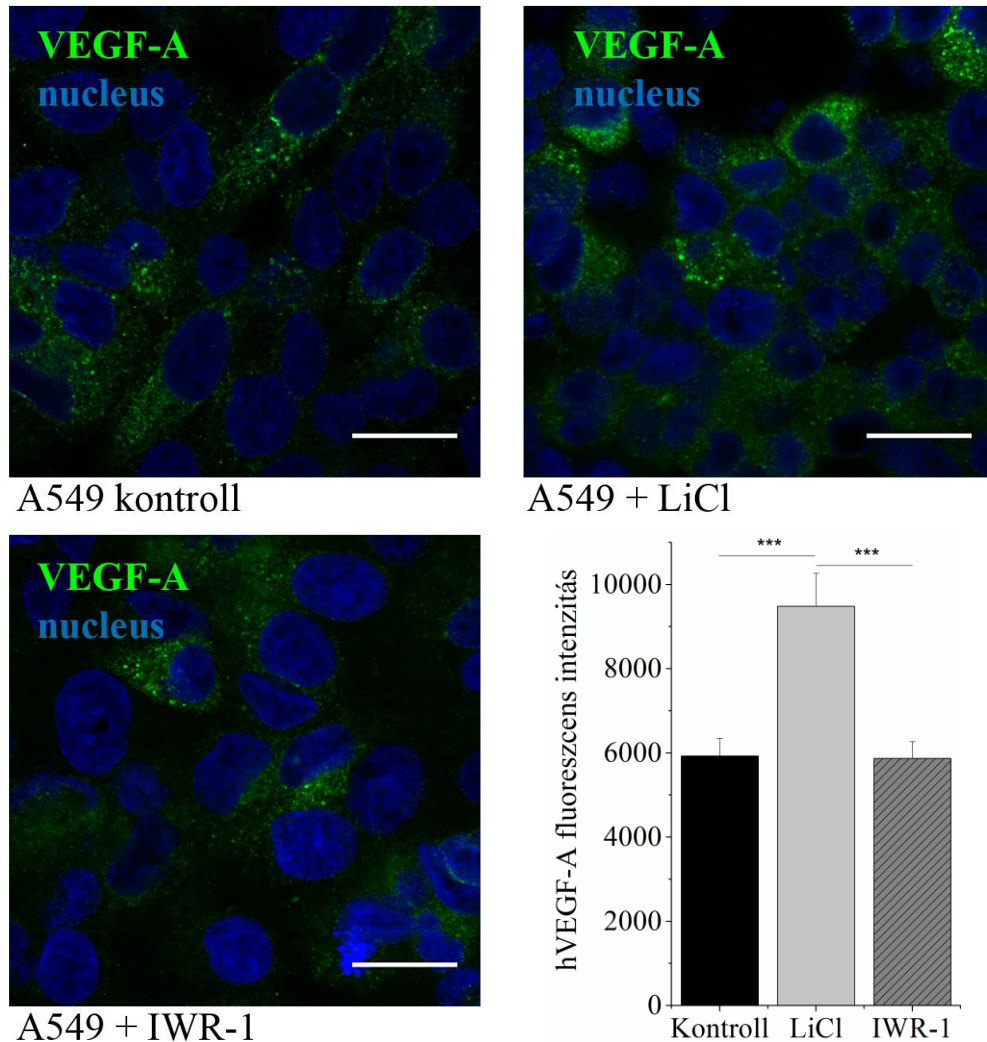
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a Wnt és PPAR útvonalak módosítása milyen hatással van a VEGF-A termelésre. Egy VEGF-A termelő tüdő tumor sejt vonalat, az AC eredetű A549 vonalat használva Wnt jelátvitel gátlásán, illetve indukálásán keresztül vizsgáltuk a PPARgamma aktivitását. PPAR kötőhelyet tartalmazó PPRE plazmával transzfektált sejtekben a beta-katenin jelátviteli utat aktiváló LiCl (10mM) kezelés hatására a PPAR promóter aktivitás szignifikánsan csökkent, míg a Wnt inhibitoroként használt IWR-1 (1µM) kezelés után az aktivitás nem változott (12/a ábra).



12. ábra: a) PPAR aktivitás alakulása, valamint b) PPARgamma és VEGF-A expresszió változása LiCl és IWR-1 kezelést (n=4) követően A549 sejt vonalon. A relatív génexpresszió változás kezeletlen kontrollhoz hasonlítva. Átlag ± SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

Ezzel párhuzamosan a VEGF-A mRNA szintje mindkét esetben növekszik (12/b ábra), míg fehérjeszinten a változás ellenkező irányú, vagyis LiCl hatására a VEGF-A szintje szignifikánsan emelkedik, IWR-1 kezelést követően pedig nem változik jelentősen (13. ábra). Ez alapján feltételezhető egy eltérő poszttranszkripció szabályozás, annál is

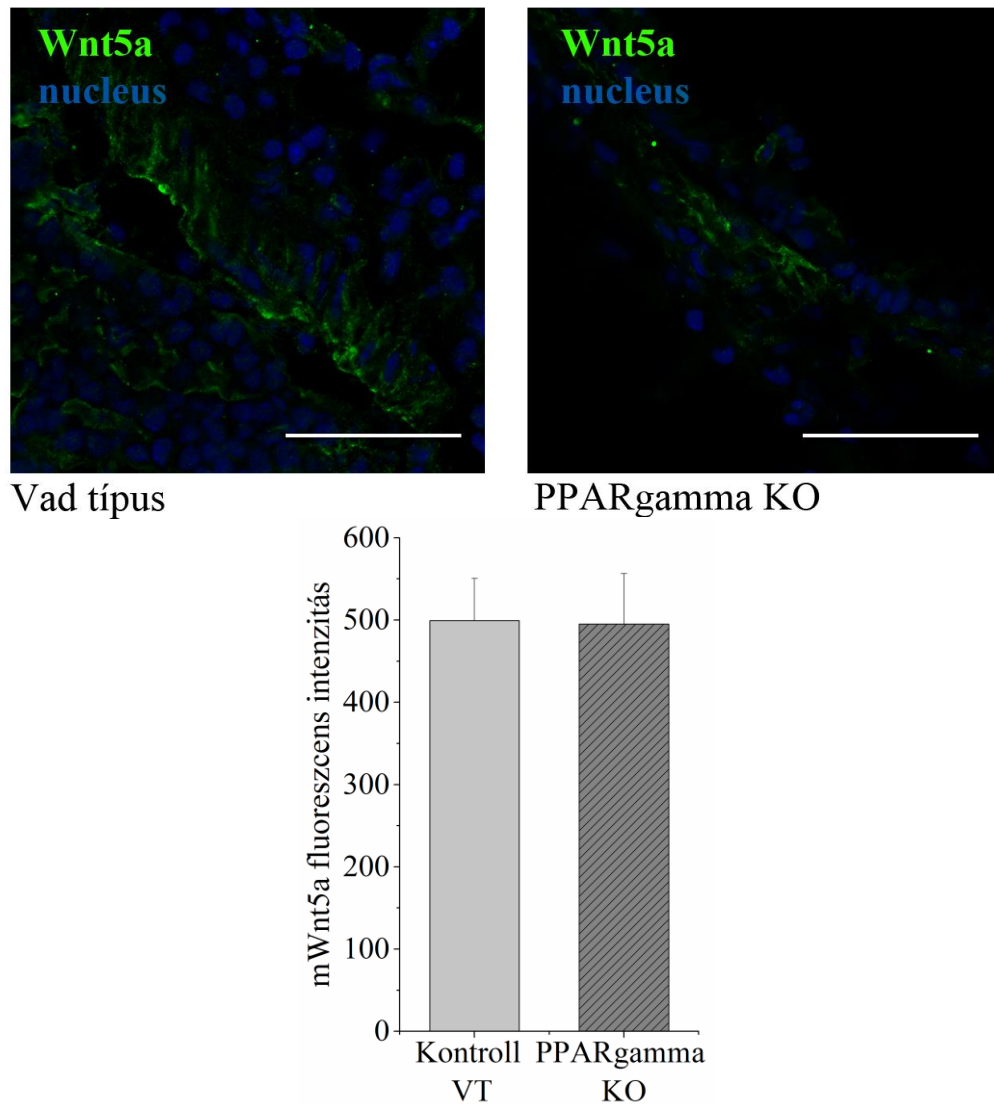
inkább, mivel a nem-kanonikus Wnt jelátvitel esetében már kimutatásra került, hogy aktiválása során a transzkripció változtatása nélkül, endoplazmatikus retikulumban tárolt molekulák, például Ca^{2+} felszabadulásához vezethet [90].



13. ábra: VEGF-A expresszió fehérjeszintű változása LiCl és IWR-1 hatására. A képek 4 különböző kísérletből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. 63x-os nagyítás, lépték 20 μm .

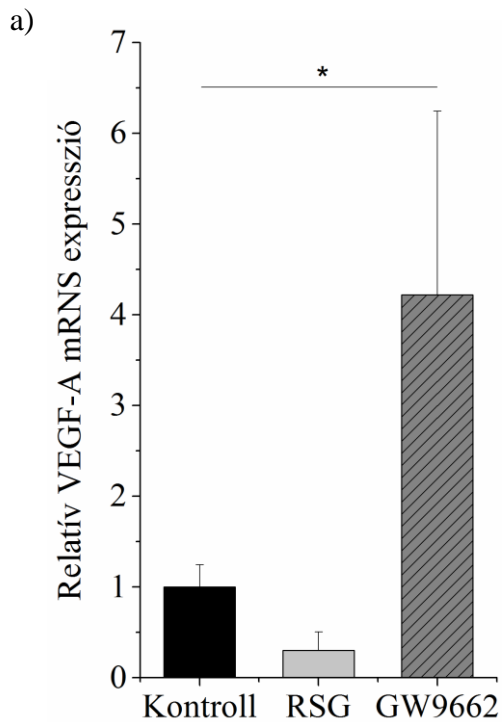
Érdekes, hogy a LiCl kezelés a PPARgamma mRNS szintű kifejeződését nem változtatja, míg az emelkedett VEGF-A szintet kiváltó PPRE aktivitást módosítja, ez is mutatva az aktivitás fontosságát. PPARgamma KO egér tüdőmetasztázisainak Wnt5a

festése szintén ezt hangsúlyozza, mivel a PPARgamma ilyen rendszerben történő alul működése nem jár a Wnt5a molekula fehérjeszintű változásával (14. ábra).

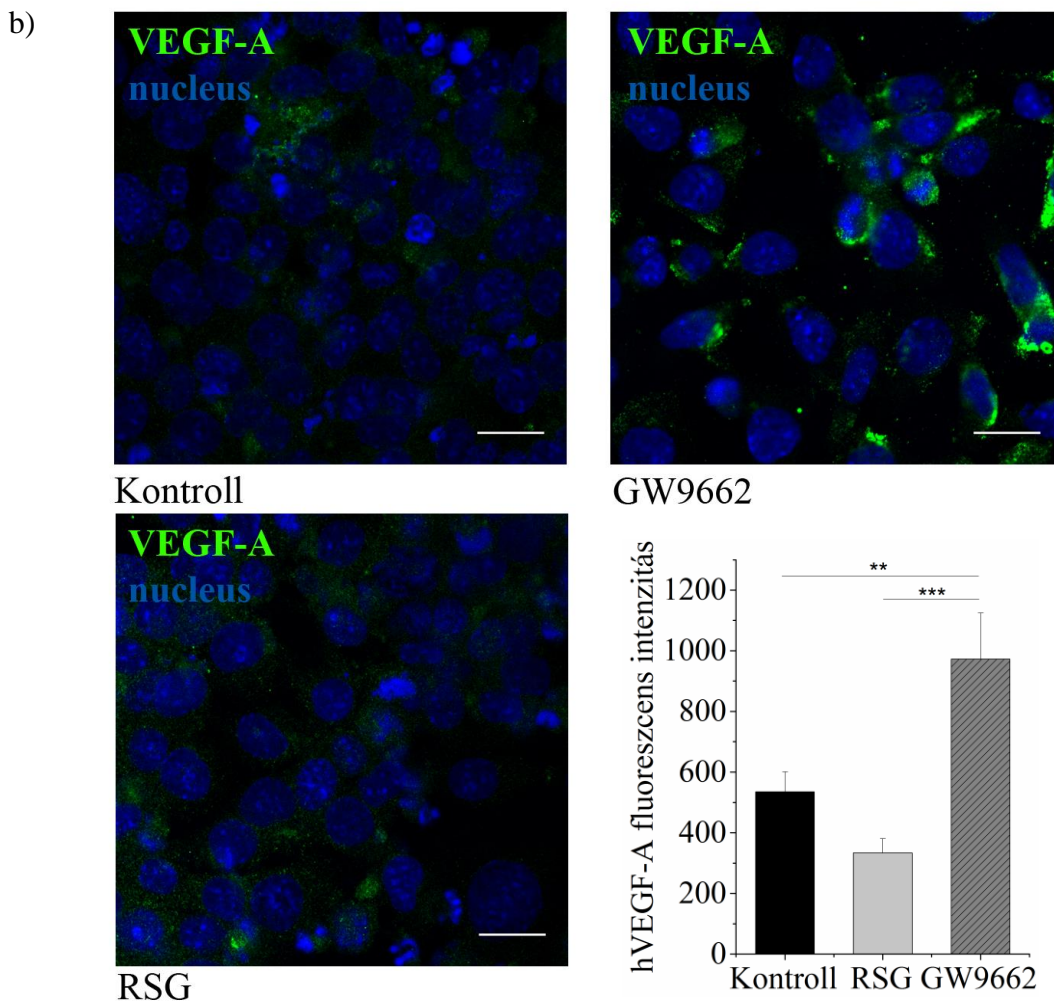


14. ábra: PPARgamma KO és vad típusú egér tüdőmetazeteinek Wnt5a festése. A képek 3 különböző egér tüdejéből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, Student t-próba. 63x-os nagyítás, lépték 50 μ m.

Mivel a PPRE riporter rendszer nem PPARgamma specifikus, ezért közvetlen PPARgamma módosítására PPARgamma agonistát és antagonistát használtunk humán primer fibroblaszt sejtvonalon. A várakozásainknak megfelelően a PPARgamma gátlására alkalmazott GW9662 növelte a VEGF-A expressziót, míg RSG jelenlétében a VEGF-A expresszió mind mRNS mind fehérjeszinten csökkenő tendenciát mutat (15. ábra).



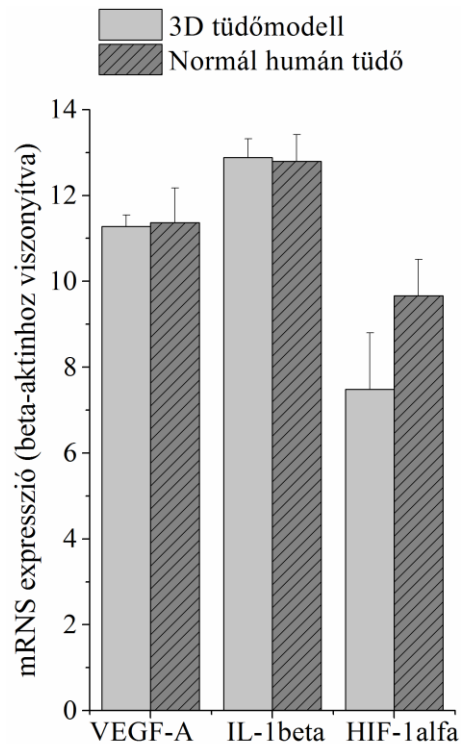
15. ábra: a) VEGF-A mRNS szintje RSG és GW9662 kezelést követően ($n=3$). A relatív génexpresszió a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. b) VEGF-A fehérjeszintű változása RSG és GW9662 kezelést követően. A képek 3 különböző kísérletből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, Student t -próba, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p<0.05$, $**p<0.01$, $*** p<0.001$. 63x-os nagyítás, lépték 20 μm .



4.5 In vitro 3D tüdőmodell

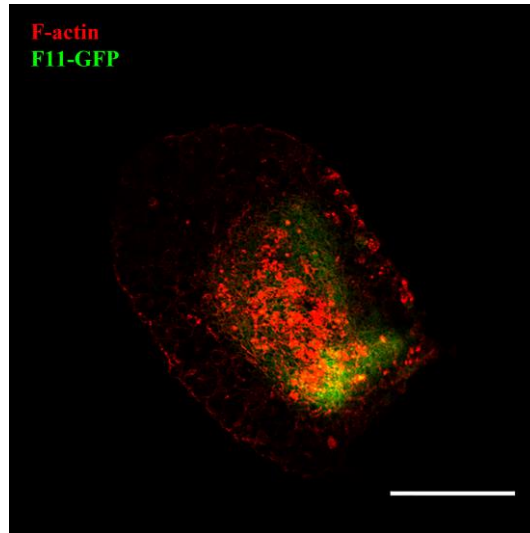
A fent említett molekulák szabályozásának vizsgálatához egy 3D disztális in vitro tüdőmodellt készítettünk, a tüdőt felépítő három fő sejt, a légzőfelületet alkotó epitelsejtek (SAEC), normál tüdő fibroblasztok (NHFL) és mikrovaszkuláris endotelsejtek (HMVEC-L) felhasználásával.

A továbbiakban megvizsgáltunk három jellemző angiogenikus faktor VEGF-A, IL-1beta és HIF-1alfa expresszióját normál humán tüdővel összehasonlítva, melynek eredménye igazolta, hogy az in vitro 3D modellünk alkalmas az angiogenezis molekuláris vizsgálatára, mert a fent említett faktorok expressziója szignifikánsan nem mutat eltérést (16. ábra).



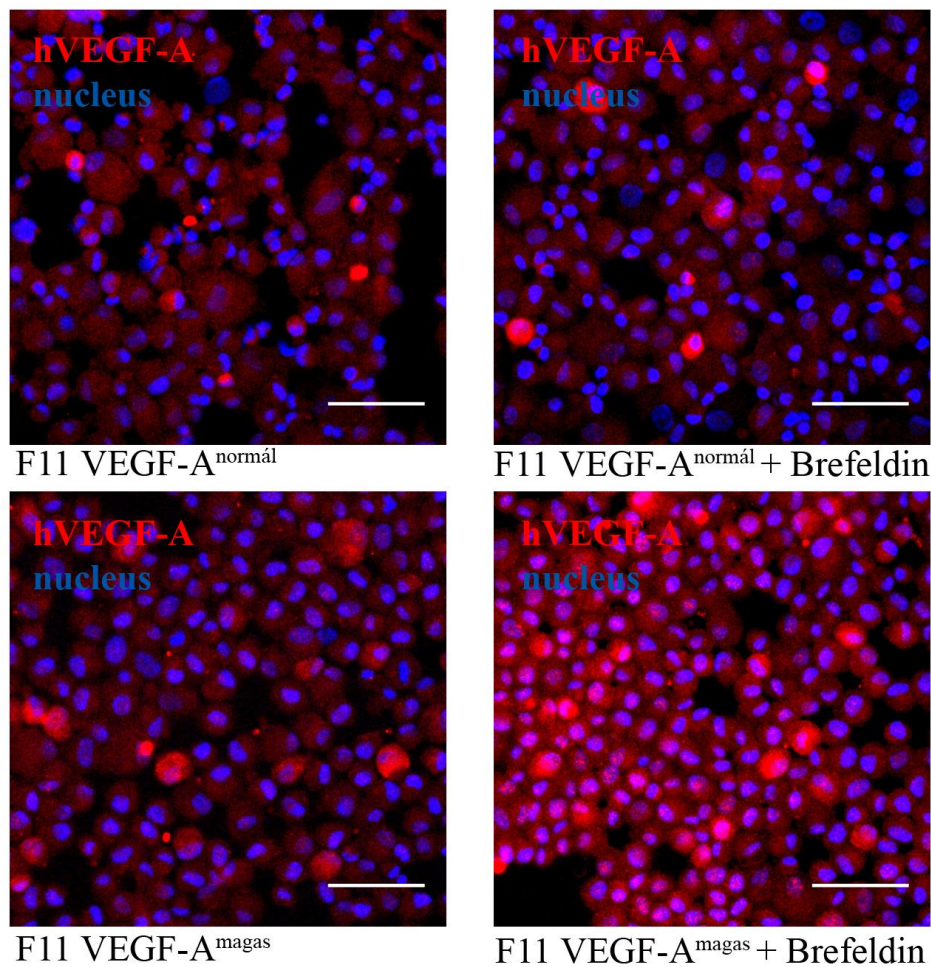
16. ábra: Három angiogenikus faktor, a VEGF-A, az IL-1beta és a HIF-1alpha génexpressziós mintázatának összehasonlítása in vitro előállított tüdő aggregátumban és normál tüdőszövetben (n=3). A génexpressziós változások beta-aktin belső kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Az emelkedett VEGF-A szint okozta hatást VEGF-A overexpresszáló fibroblasztot tartalmazó és normál expressziós szinttel jellemezhető aggregátum összehasonlításával vizsgáltuk. Humán fibroblaszt sejtvonalba (F11) GFP kapcsolt VEGF-A gént vittünk be, így a VEGF-A overexpresszió GFP intenzitással együtt láthatóvá vált (17. ábra).



17. ábra: Normál, humán epitélsejtek (SAEC), normál fibroblasztok (F11) és mikrovaskuláris endotélsejtek (HMVEC-L) felhasználásával készült *in vitro* 3D tüdőaggregátum. VEGF-A-GFP-t overexpresszáló fibroblasztok alkotják a modell központi magját. Az összes sejt aktin filamentumait AlexaFluor 555 konjugáltummal ellátott phalloidinnal jelöltük. 10x-es nagyítás, lépték 100 μm .

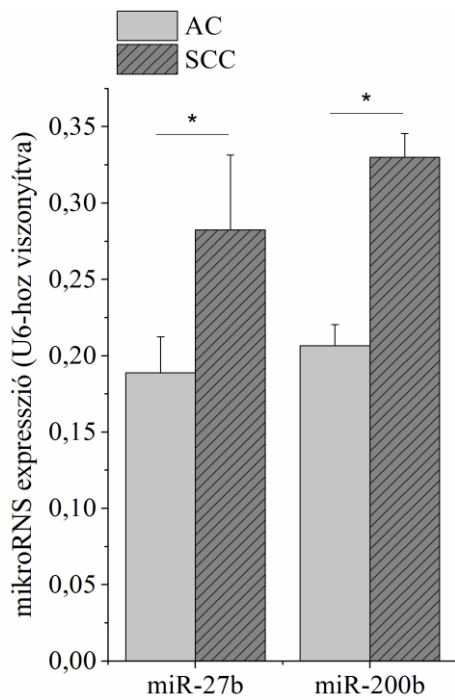
Annak igazolására, hogy a VEGF-A a normál állapotokhoz hasonlóan szekretált formában expresszálódik, a sejteket fehérjetranszport gátlására használt Brefeldin-A-val kezeltük. Citopreparátumot készítve immunfluoreszcens festéssel tettük láthatóvá a VEGF-A molekulát. A képeken látható, hogy alapállapotban a fibroblaszt sejtek rendelkeznek VEGF-A expresszióval, mely a kezelés hatására fokozottabb, ugyanis a sejtekben gátolt fehérje transzport miatt, az amúgy szekretált fehérje a citoplazmában marad. Az overexpresszáló sejtekben alapállapotban is magasabb VEGF-A szint mutatható ki, amely különösen jól látható a Brefeldin-A kezeléssel kiváltott szekréción gátlással (18. ábra).



18. ábra: VEGF-A overexpresszió és szekréció. 20x-os nagyítás, lépték 50 μ m.

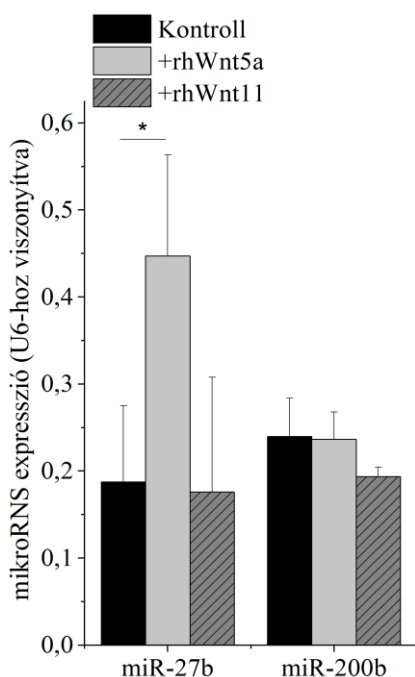
4.6 mikroRNS-ek szerepe az angiogenezisben

Az eddigi eredményeink egy érdekes kérdést vetettek fel. Kísérleteink szerint csak a beta-katenin függő kanonikus jelátvitel csökkenti a PPAR γ expressziót és ezzel együtt emeli a VEGF-A szintet. Az SCC magas Wnt5a expresszióját nézve nem volt egyértelmű, hogy a nem-kanonikus Wnt túlsúllyal jellemezhető SCC esetén miként váltanak ki hasonló mechanizmust. A mikroRNS-ek szinte minden sejtszintű folyamat szabályozásában szerepet játszanak, így az angiogenezisben is [91] [92]. Mivel az irodalom egyértelműen összekapcsolja a miR-27b és miR-200b molekulákat a Wnt, PPAR γ és VEGF-A jelátvitellel [93] [94] [95] [96], figyelmünket erre a két molekulára összpontosítottuk. Megvizsgálva a miR-27b és miR-200b molekulákat primer humán tüdőminták esetében azt láttuk, hogy az AC betegekben szignifikánsan alacsonyabb szintet mutatott mindkét mikroRNS az SCC mintákhoz képest (19. ábra).



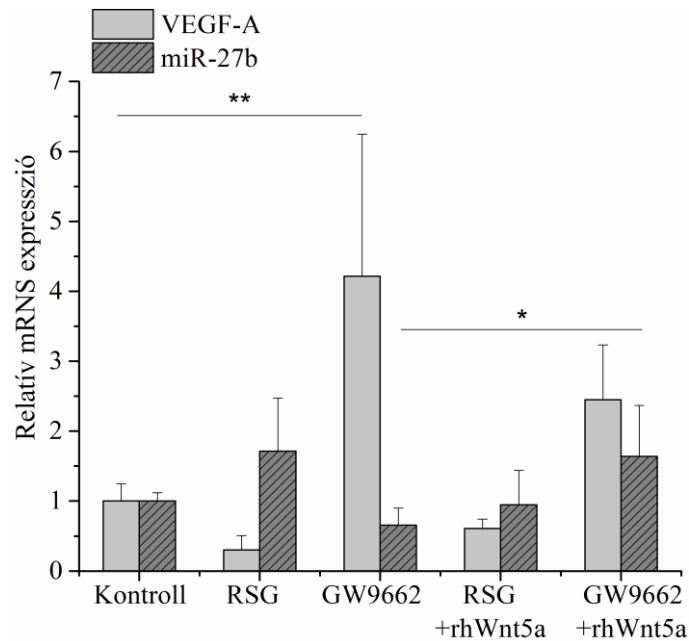
19. ábra: miR-27b és miR-200b expressziója AC (n=5) és SCC (n=5) tüdő tumorokban. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

A vizsgálatainkat tovább folytattuk abban az irányban, hogy a két nem kissejtes tüdőrák altípus különbözik-e a mikroRNS-ek Wnt-függő szabályozásában, ezért a fent említett három sejttípust tartalmazó 3D tüdőmodellt rekombináns, humán Wnt5a és Wnt11 kezelésnek vetettük alá. Az SCC mintákra jellemző Wnt5a molekula a miR-27b szintet szignifikánsan emelte, míg a miR-200b-re nem volt hatással. Ugyanez elmondható a Wnt11 kezelésre is, mivel egyik vizsgált molekulát sem befolyásolta (20. ábra).



20. ábra: miR-27b és miR-200b expressziója 3D tüdő aggregátumokban rekombináns Wnt5a és Wnt11 kezelés hatására. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

A fent említett fibroblaszt rendszert, valamint PPARgamma agonista/antagonista kezelést rekombináns Wnt5a molekulával kiegészítve azt láttuk, hogy PPARgamma agonista (RSG) jelenlétében a rekombináns Wnt5a kezelés nem tudta emelni a miR-27b szintjét, viszont antagonistá (GW9662) kezelést követően igen. Azonban a VEGF-A expressziós szintje alacsonyabb volt, mint kizárólag PPARgamma antagonistá kezelés hatására, hasonló mintázatot mutatva az SCC mintákban tapasztaltakkal (21. ábra).

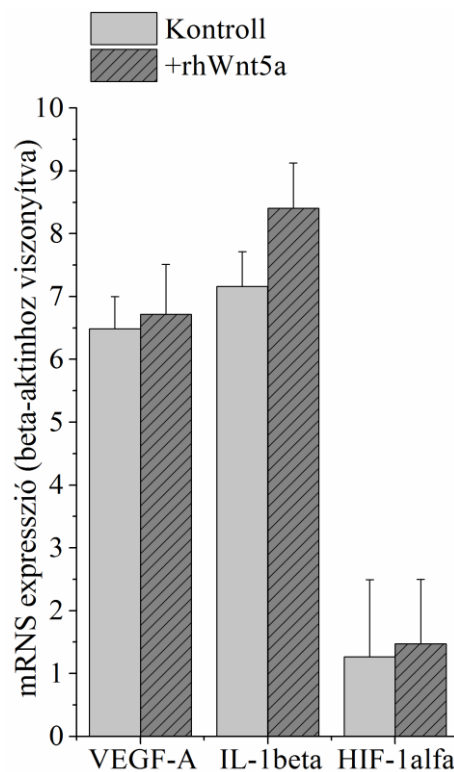


21. ábra: VEGF-A mRNS és miR-27b expressziós szintje PPARgamma specifikus agonista (RSG) és GW9662 antagonistá kezelést követően (n=3). A relatív génexpresszió a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Átlag ± SEM, Student t-teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A fentiek tükrében világossá vált, hogy a Wnt mikro környezetben tapasztalható különbségek és a PPARgamma aktivitására gyakorolt hatásuk fontos szabályozó szerepet látnak el. A kanonikus és nem kanonikus Wnt-ok hatására a mikroRNS-ek expresszióját befolyásolva, szignifikáns, a terápiás választ is befolyásolni képes különbségek alakulhatnak ki a nem kissejtes tüdőrák két altípusában.

4.7 A Wnt5a hatása az endotélsejtek proliferációjára

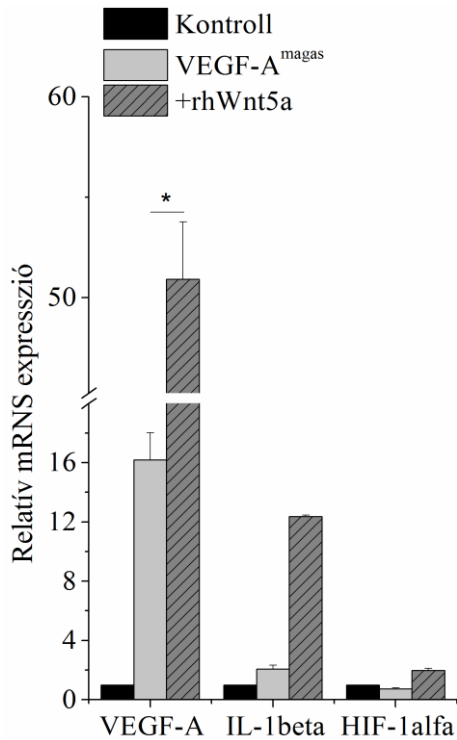
Ezt követően az SCC mintákban túlsúlyban lévő Wnt5a molekula szerepét tovább vizsgáltuk az angiogenesis szabályozásában, így a 3D tüdőmodelleket rekombináns humán Wnt5a kezelésnek vetettük alá és VEGF-A, IL-1beta és HIF-1alfa expresszióját vizsgáltuk qPCR módszerrel. Egyik vizsgált molekula kifejeződésében sem volt szignifikáns eltérés, így feltételeztük, hogy a Wnt5a nem közvetlen szabályozó molekulája az érképzés folyamatának (22. ábra).



22. ábra: VEGF-A, IL-1beta és HIF-1alfa expressziójának változása rekombináns Wnt5a kezelést követően (n=3). A génexpressziós változások beta-aktin belső kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

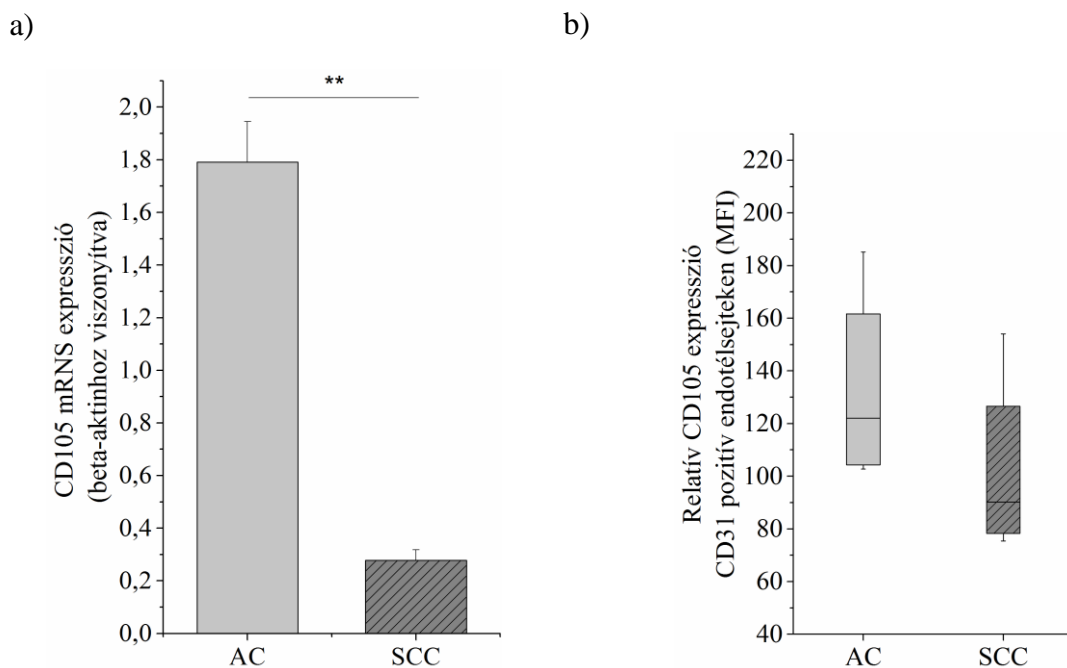
Mivel a Wnt5a a kísérleteinkben nem emelte a VEGF-A expressziót, megvizsgáltuk, hogy az angiogenesis aktivációjában milyen szerepe lehet, feltételezve, hogy emelkedett VEGF-A környezetében a Wnt5a módosíthatja a VEGF-A által indukált angienezist. VEGF-A túltermelő fibroblaszt sejtvonalat a már említett epitel- és endotélsejtekkel

együtt 3D kultúrában tenyésztettük és rekombináns humán Wnt5a-val kezeltünk. Érdekes módon emelkedett VEGF-A környezetben a Wnt5a nem szignifikánsan emelte az angiogénikus faktorok mRNS szintjét (23. ábra).



23. ábra: VEGF-A, IL-1beta és HIF-1alfa expressziójának változása normál és emelkedett VEGF-A szint mellett és rekombináns Wnt5a kezelést követően (n=3). Az ábrán a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív expresszió látható. Átlag ± SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

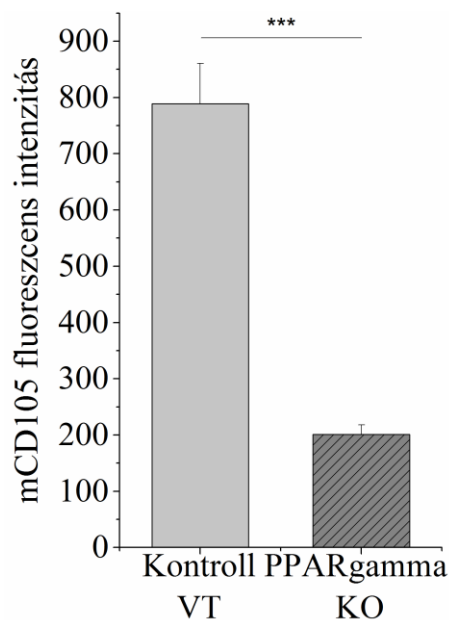
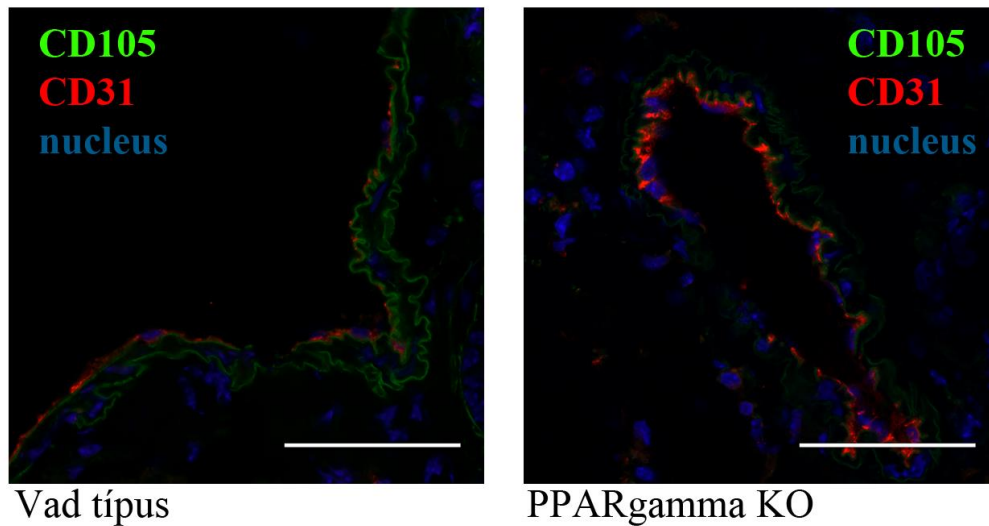
A fenti kísérletekből úgy látszik, hogy a Wnt5a nem közvetlen szabályozó molekulája az angiogenikus markerek expressziójának, ezért a következőkben az endotélsejtek proliferációjára gyakorolt lehetséges hatását vizsgáltuk. A fokozott osztódási aktivitást jelző CD105 molekulát primer humán tüdőmintákon analizálva azt tapasztaltuk, hogy az AC esetében a CD105 marker szignifikánsan magasabb szinten mutatható ki mRNS szinten, mint az SCC mintákban (24/a ábra). Fehérjeszintű kifejeződése szintén emelkedő tendenciát mutat (24/b ábra).



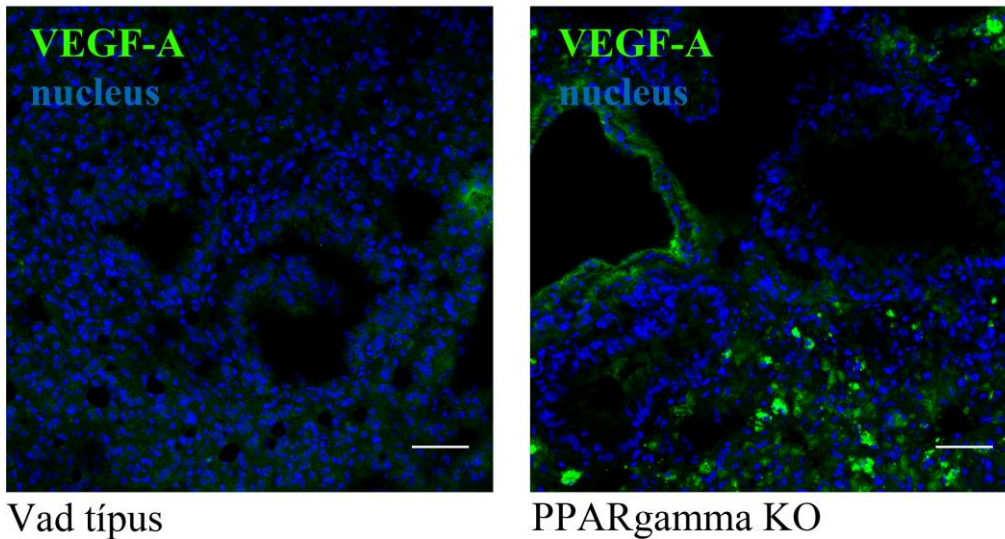
24. ábra: a) CD105 génexpresszió beta-aktin belső kontrollhoz viszonyítva, AC (n=11) és SCC (n=12) tüdőmintákban. Átlag \pm SEM, Student t-próba. b) Az CD105 relatív fehérjeszintű expressziója CD31+ endotélsejteken AC (n=6) és SCC (n=6) tüdőmintákban. Medián + interkvartilis + alsó/felső kvartilis terjedeleme, Student t-próba, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A humán minták vizsgálatából kiderült, hogy mind a két tumor altípus esetében a PPARgamma szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszálódik a normál tüdőhöz viszonyítva, míg a VEGF-A mRNS szintje drasztikusan emelkedett (9. ábra). Ezen mintázat alapján egy emelkedett tumor angiogenezist feltételezünk mindkét esetben, azonban az endotélsejtek proliferációs markere, a CD105, ellentétes kifejeződést mutat. Várakozásainkkal ellentétben a PPARgamma KO egérmodellben a CD105 fehérje

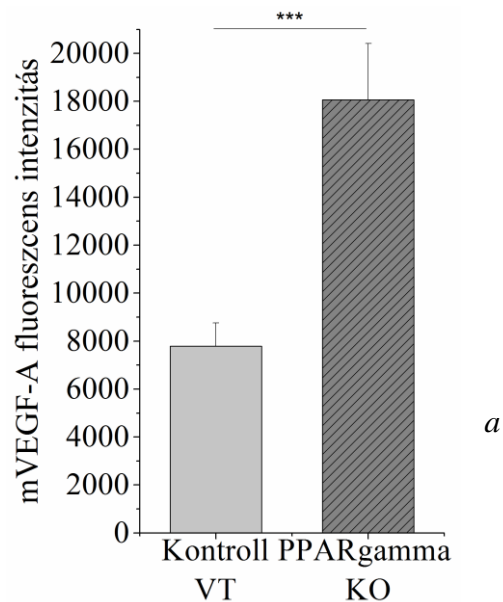
mennyisége szignifikánsan csökkent a CD31 pozitív endotélsejtekben (25. ábra), csak úgy, mint az SCC esetében, ahol szignifikánsan alacsonyabb expresszió látható az AC mintákhoz képest. Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy az emelkedett VEGF-A szint, mely szintén megfigyelhető mind a PPARgamma KO egérmodellben (26. ábra), mind pedig a két nem kissejtes tüdőrák altípusnál, nem elegendő az endotél proliferáció indukálásához.



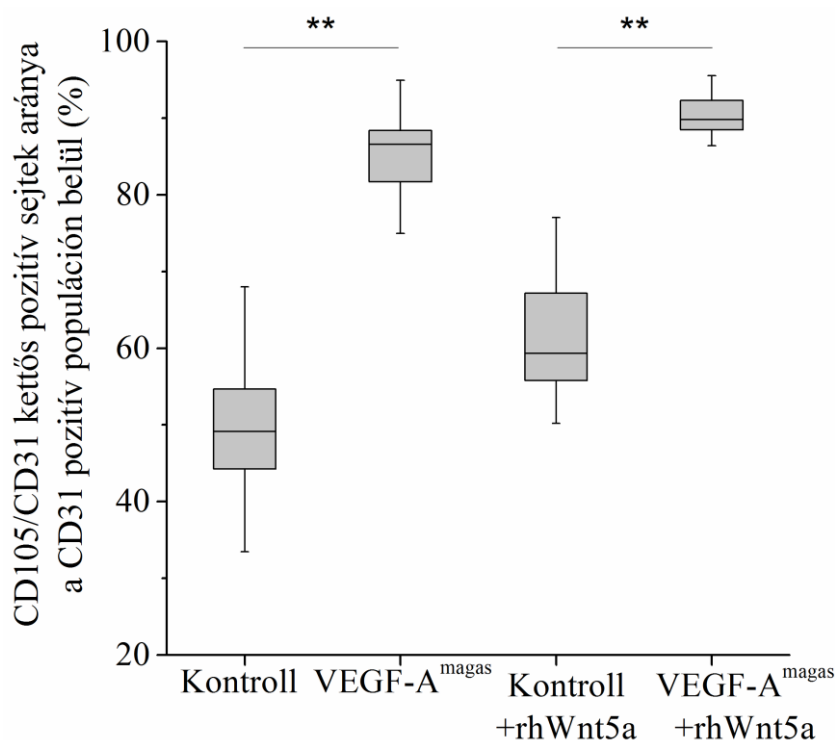
25. ábra: CD31+ endotélsejtek CD105 expressziós szintjének a vizsgálata PPARgamma KO és vad típusú egér tüdőmetszeteken. A képek 3 különböző egér tüdejéből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, Student t-próba, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. 63x-os nagyítás, lépték 50 μ m.



26. ábra: VEGF-A kifejeződésének vizsgálata PPARgamma KO és vad típusú egér tüdőmetszeteken. A képek 3 különböző egér tüdejéből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, Student t-próba, ahol különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. 20x-os nagyítás, lépték 50 μ m.



A két karcinóma Wnt környezetében és az említett CD105 expresszióban tapasztalt megfigyelésekből feltételezve teszteltük a Wnt5a szerepét az endotélsejtek proliferációjában. 3D in vitro modellrendszer összeállítását követően a ko-kultúrákat rekombináns Wnt5a molekulával kezeltük és áramlási citométerrel analizáltuk. A VEGF-A expresszió növekedése a CD105 fokozott kifejeződését vonja maga után, míg Wnt5a kezelés hatására ez a hatás szignifikánsan nem változik (27. ábra). A fentiekből elmondható, hogy a Wnt5a közvetlenül nem szabályozza az angiogenezishez kapcsolódó gének expresszióját mRNA szinten, illetve az endotélsejtek VEGF-A által indukált proliferációját nem módosítja.



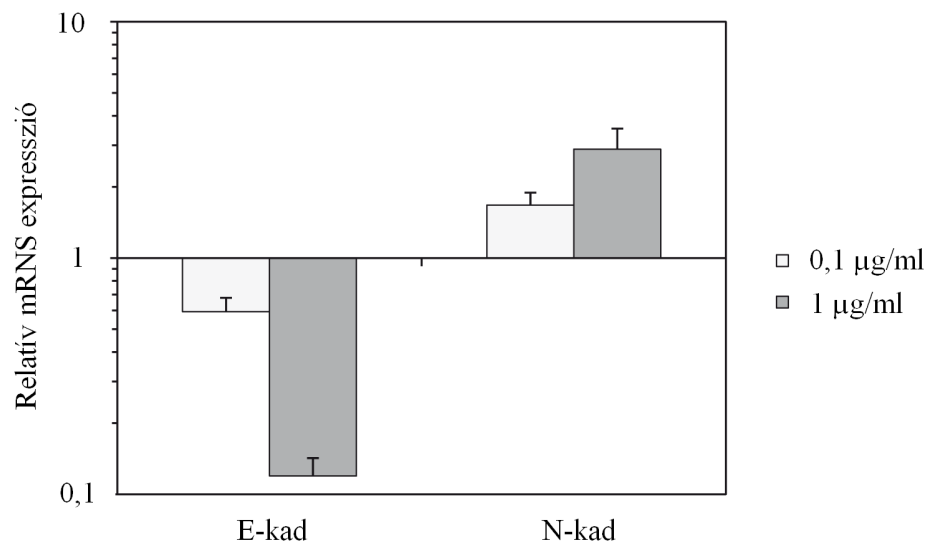
27. ábra: CD105 expresszió megjelenése CD31 pozitív endotélsejteken, normál és emelkedett szintű VEGF-A expresszióval jellemezhető 3D tüdőmodellben. Medián + interkvartilis + alsó/felső kvartilis terjedelem. ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A két karcinóma közti eltérő érzékelés, ugyanakkor a VEGF-A és PPAR γ megegyező irányú változása és a Wnt5a lehetséges szabályozó szerepe további vizsgálatokat indított el. Mivel közvetlen génexpressziós változásokat nem tapasztaltunk Wnt5a hatására, ezért funkcionális vizsgálatot végeztünk az endotélsejtek migrációját alapul véve.

4.8 Wnt5a és kadherine

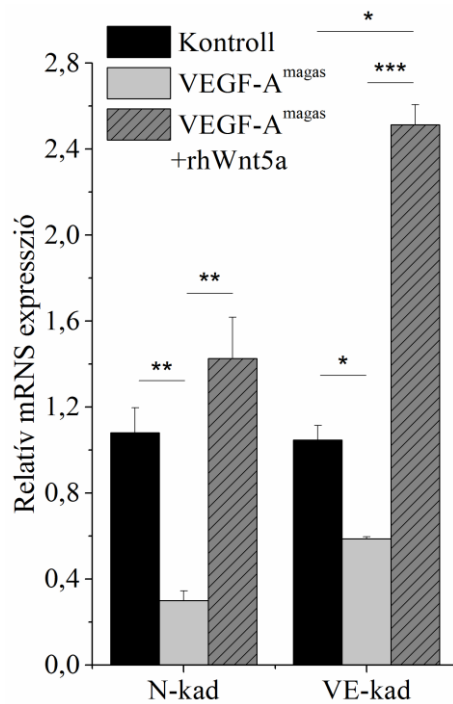
A kadherin molekulák monotipikus és heterotipikus sejt-sejt kapcsolatok létrejöttéért és fenntartásáért felelős adhéziós molekulák, amelyek a fejlődés során a sejtek megfelelő helyekre vándorlását segítik, továbbá a szöveti integritás megőrzéséért felelősek a felnőtt élet során. E-kadherin főként az epitélsejtekre jellemző, míg N- és VE-kadherin az endotélsejtekben található [97]. A kadherin molekulaegyensúly megváltozása a tumoros folyamatok egyik meghatározó jellemzője. A Wnt5a primer humán

epítéjsjtben megváltoztatja a kadherinekn expressziós profilját. Az E-kadherin szintjét csökkenti, míg az N-kadherint növeli a rekombináns Wnt5a molekula (28. ábra).



28. ábra: SAEC normál epítél sejt kultúra E- és N-kadherin mRNS expressziója 72 órás 0,1 µg/ml és 1 µg/ml rekombináns Wnt5a kezelést követően (n=5). A relatív génextpresszió a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Átlag ± SEM.

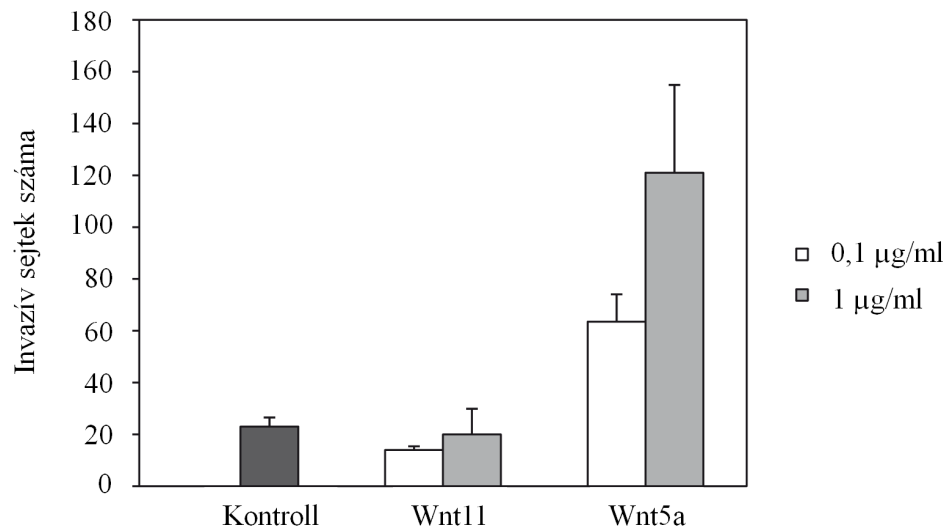
Ezt követően az angiogenezis vizsgálatában a figyelmünket az endotélsejteket szorosabban érintő VE-kadherin vizsgálatára összpontosítottuk. 3D tüdőmodellünket vizsgálva láttuk, hogy emelkedett VEGF-A mRNS expresszió esetén mind az N-kadherin, mind a VE-kadherin mRNS szintje csökken, amelyet a Wnt5a kezelés szignifikánsan megemelt (29. ábra).



29. ábra: 3D tüdőmodell N- és VE-kadherin génexpressziójának változása emelkedett VEGF-A és rekombináns Wnt5a kezelést követően (n=3). A relatív génexpresszió a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Átlag ± SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

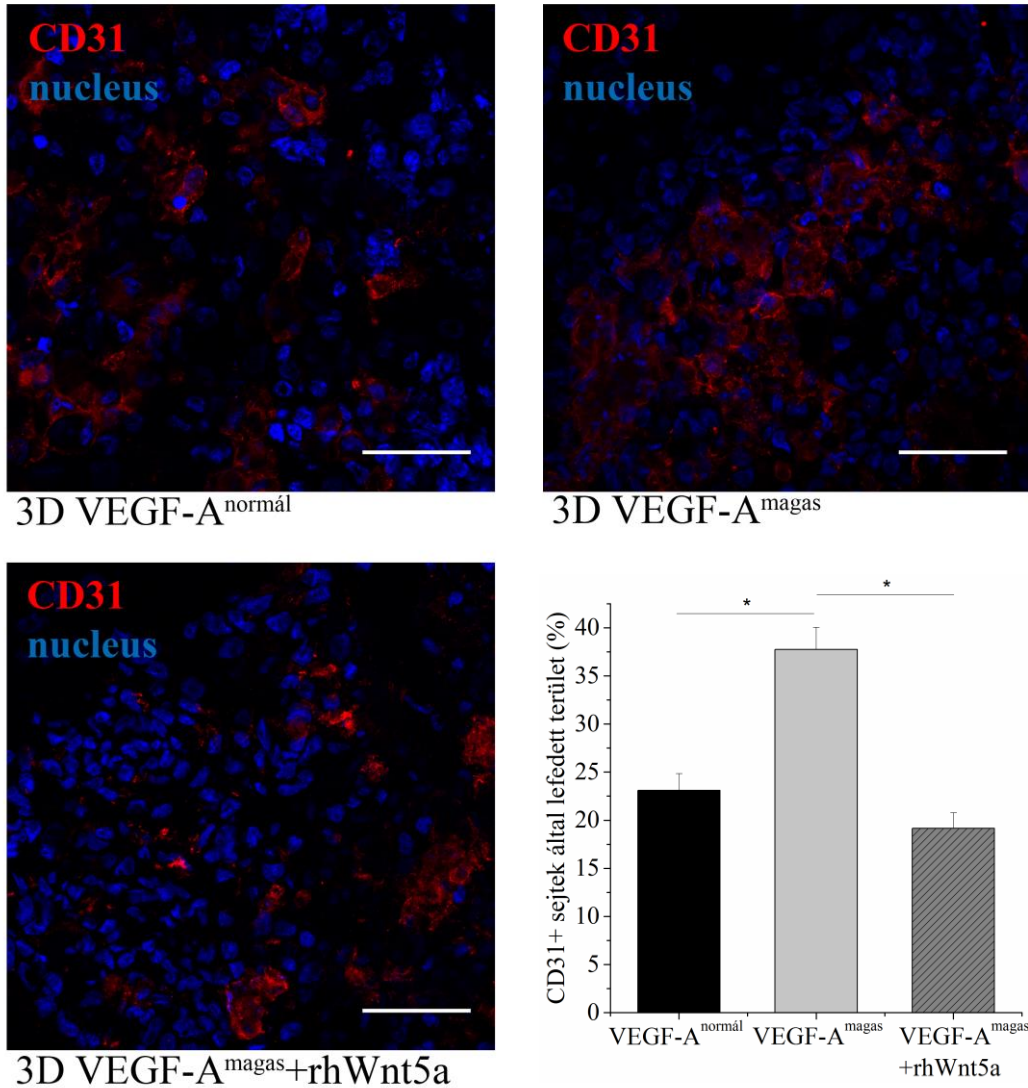
4.9 A Wnt5a szerepe a sejtmigrációban

A megváltozott kadherin expresszió a sejtek motilitásában is változásokat okozhat, így kezdtük el vizsgálni a Wnt5a szerepét a sejtek migrációjában. Nem tumoros eredetű, normál epitelsejtek migrációja rekombináns Wnt5a kezelés hatására nagyobb mértékben megnő összehasonlítva a Wnt11 kezeléssel (30. ábra).



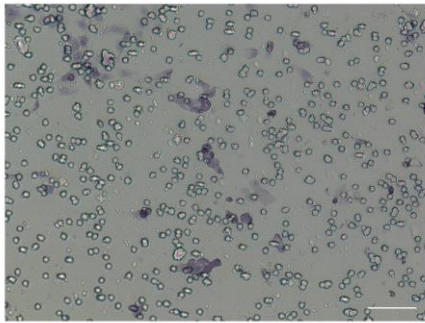
30. ábra: SAEC sejtkultúra kadherin mRNS expressziója 72 órás 0,1 µg/ml és 1 µg/ml rekombináns Wnt5a kezelést követően (n=3). A relatív génexpresszió a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Átlag ± SEM.

A Wnt jelátvitel hatása nem csak epitelsejteken lehet jelentős. Az előzőekből következőleg a Wnt5a nincs közvetlen hatással az angiogénikus faktorok expressziójára, viszont a VEGF-A által közvetített hatást módosíthatja. Ennek vizsgálatára normál fibroblasztot és VEGF-A túltermelő sejtet tartalmazó epitél- endotél 3D ko-kultúrákat Wnt5a molekulával kezeltük és az endotélsejtek migrációját az endotél marker anti-CD31 immunfluoreszcens festésével tettük láthatóvá. A festések jól mutatják, hogy normál VEGF-A szint jelenlétében az endotélsejtek diffúzan vannak jelen a 3D szferoidban, míg az általában a szferoid közepét alkotó fibroblasztok és az általuk termelt VEGF-A többlet elősegítette az endotélsejtek migrációját. Amíg a VEGF-A fokozott jelenléte az endotélsejtek vándorlását pozitívan befolyásolja, addig a rekombináns Wnt5a kezelés ezt a hatást gátolja, így az erek falát alkotó sejtek vándorlása nem valósul meg, szórt eloszlást mutatnak (31. ábra).

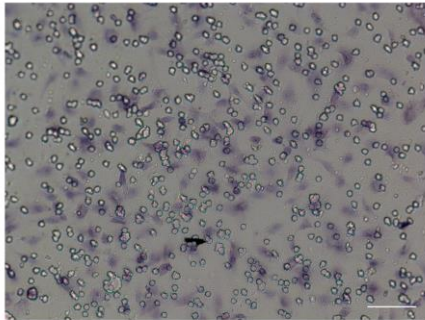


31. ábra: HMVEC-L endotélsejtek mintázatának változása emelkedett VEGF-A szint és rekombináns Wnt5a kezelés hatására. A képek 3 különböző kísérletből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. 63x-os nagyítás, lépték, 50 μ m.

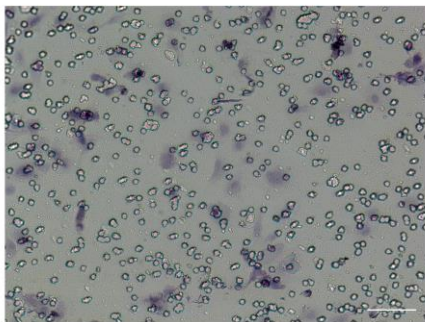
A Wnt5a endotélsejtekre gyakorolt gátló hatását bizonyítandó HMVEC-L primer endotélsejtek migrációját vizsgáltuk. A függesztett sejtenyésző betétbe kített endotélsejtek VEGF-A túltermelő fibroblaszt sejtekkel szemben szignifikánsan gyorsabban vándoroltak, mint a normál VEGF-A környezetet biztosító fibroblasztok felé. Míg a fehérjeszinten megnövekedett VEGF-A hatását a médiumhoz adott rekombináns, humán Wnt5a csökkentette (32. ábra).



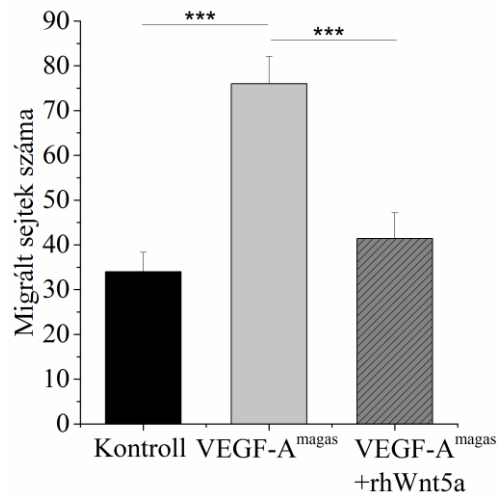
Kontroll



VEGF-A^{magas}



VEGF-A^{magas}+rhWnt5a



32. ábra: VEGF-A és Wnt5a hatásának vizsgálata endotélsejtek migrációjára. A képek 3 különböző kísérletből kiválasztott reprezentatív képek. Átlag \pm SEM, ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns, ha $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $*** p < 0.001$. 10x-es nagyítás, lépték 100 μ m.

5. Összefoglalás

Az angiogenezis mind a normál, mind a kóros folyamatok szerves részét képezi. Az életkor előrehaladtával sok olyan molekuláris változás következik be, amelyek elősegítik a kóros folyamatok kialakulását. Az öregedés során lezajló sejtszintű események vizsgálata során számos olyan faktort azonosítottak, amelyek szerepet játszanak az endotélsejtek öregedésében is, valamint elősegítik a tumorok kialakulását [98]. Az antioxidánsként számon tartott szuperoxid dizmutáz aktivitásának csökkenése, valamint a csökkent nitrogén oxid jelátvitel együttesen olyan DNS károsodásokat okoz, amelyek végső soron a regenerációs folyamatok gyengüléséhez vezetnek. Regeneráció hiányában mind a struktúra, mind a funkció sérülést szenved. A tüdőben található endotélsejtek a többi sejttípussal együtt szintén érintettek a fent említett változásokban, amelyek együttesen hozzájárulnak olyan időskori betegségek kialakulásához, mint például a tüdőben megemelkedett vérnyomás [5]. Az életkor előrehaladtával a rákos megbetegedések előfordulási gyakorisága drasztikusan nő, a diagnosztizált daganatok 60%-a 65 év felett fordul elő, 70%-os halálozási aránnyal [99]. Az egyik leggyakrabban kialakuló daganattípus a nem kissejtes tüdőrák, melynek alacsony 5-éves túlélési rátája mindössze 15% körül mozog [3] [4]. A kimagaslóan alacsony túlélési arány a késői diagnózissal és a megfelelő terápia hiányával függhet össze. Az érképzés kitűnő célpontnak bizonyult számos tumor esetében, javuló túlélési statisztikákat produkált nem kissejtes tüdődaganatok esetében is, azonban mindez csak az AC altípusra mondható el. SCC esetén 10-ből 6 esetben súlyos vérzéssel járó mellékhatások jelentkeztek, amelynek következtében ezt a betegcsoportot nem kezelhették tovább angiogenezis gátló szerrel, például az ismert anti-VEGF-A ellenanyaggal, a bevacizumabbal [38] [39]. A mechanizmus, amely a súlyos vérzéshez vezet bevacizumab kezelést követően, egyelőre nem ismert, viszont számos tanulmány bizonyítja, hogy az endotélsejtek regenerációs mechanizmusának gátlása [100] vagy a tumor főbb erekhez közeli elhelyezkedése felelős lehet a fellépő mellékhatásokért [101]. Az angiogenezis bonyolult folyamata tovább nehezíti a kérdés megválaszolását. Az érképzés folyamatában a fő VEGF útvonal mellett szerepet játszó fibroblaszt növekedési faktor, bFGF és a vérlemezke eredetű növekedési faktor, PDGF szintén a célzott terápia kutatásának középpontjában van [43]. Annak ellenére, hogy az AC és SCC tumorok célzott kezelésére irányuló kutatások intenzíven folynak [102], az

érképzést gátló szerek alkalmazására adott drasztikusan eltérő reakcióra jelenleg nincs magyarázat.

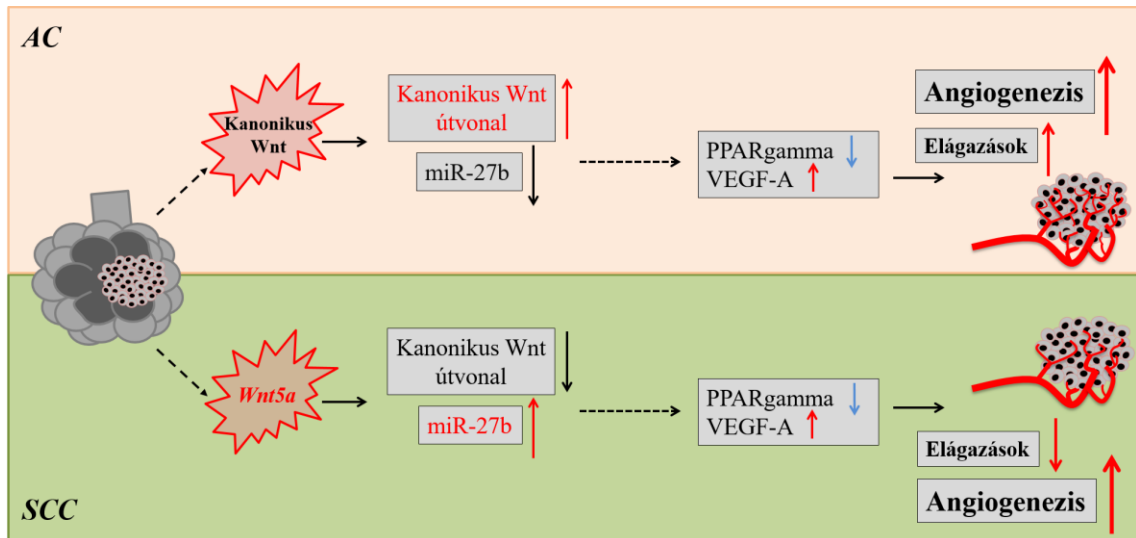
A Wnt jelátvitelben tapasztalt eltérés és az endotélsejtekre gyakorolt hatása válaszul szolgálhat a kezeléseknél tapasztalt eltérésre. Az SCC tumorokat emelkedett Wnt5a szint és aktivált nem-kanonikus Wnt jelátviteli út jellemzi, míg AC daganatokban a beta-katenin függő útvonal az aktívabb. Az itt megfigyelt Wnt mikrokörnyezeti változások képesek megváltoztatni a PPARgamma szintet és aktivitást, amely szoros kapcsolatban áll számos fiziológiai folyamat szabályozásával. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a tüdőben megfigyelhető időskori változásokhoz a kanonikus és nem-kanonikus Wnt mikrokörnyezet szervesen hozzájárul a PPARgamma molekulán keresztül [51]. A PPARgamma az adipogenezis és glükóz homeosztázis ismert szabályozója, az endotélsejtekre is kiterjedt hatást gyakorol, mely már több évtizede ismert tény [103]. A PPARgamma szerepet játszik a vazodilatáció és az endotélsejtek osztódásának szabályozásában [103][104], mely ismeretek fényében feltételezhető, hogy a beta-katenin függő PPARgamma aktivitás csökkenése okozhatja a VEGF-A módosításán keresztül az angiogenezis megváltozását és közvetve a tüdő karcinogeneziséhez vezet idősebb korban. Érdekes módon a PPARgamma hatása a VEGF-A expresszióra szöveti rendszerenként változó lehet. Egyes esetekben a PPARgamma gátló szerepét írták le, míg más publikációk alapján VEGF-A expresszió aktiválására képes [64][105]. Kísérleteink szerint a PPARgamma által közvetített hatás a szöveti mikrokörnyezetben jelenlévő kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulák arányától függ. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a PPARgamma molekulának szerepe lehet az öregedés során megváltozott és a tumor kialakulásával kapcsolatos érzékeléssel. Ismert tény, hogy a PPARgamma magasabb az SCC tumorokban AC betegekhez képest [106], viszont az általunk vizsgált betegpopulációban normál tüdőmintákhoz hasonlítva mindkét daganattípusban szignifikánsan alacsonyabb a PPARgamma expresszió, ami mindkét esetben emelkedett VEGF-A szinttel párosult. Mivel a VEGF-A és CD105 mRNS és fehérjeszint magasabb az AC mintákban az SCC esetekhez képest, azt feltételezhetjük, hogy a PPARgamma eltérő szabályozási szereppel bírhat a különféle faktorok változó arányainak jelenlétében.

Vajon mi okozhatja ezt az eltérést? Mivel a PPARgamma szükséges a VEGF-A upregulációjához, illetve a kanonikus Wnt függő jelátviteli útvonalon keresztül a

PPARgamma expresszió csökkenése váltható ki, azt gondoljuk, hogy az eltérő Wnt mikrokörnyezet állhat a VEGF-A endotélre kifejtett hatásának a hátterében. Annál is inkább valószínűsíthető ez a szabályozó mechanizmus, mivel a jellemzően nem-kanonikus Wnt5a emelkedett szintje az SCC tumorokra jellemző, amely mikrokörnyezet az emelkedett VEGF-A szint ellenére az endotél migráció gátlásának kedvez. Az SCC esetében jellemző molekuláris mikrokörnyezet a megnövekedett VE-kadherin expresszió keresztül az endotélsejtek összekapcsolódását is képes megakadályozni, amely viszont elengedhetetlen feltétele a működőképes véredények kialakulásának [107].

További meghatározó kísérleti eredményünk, hogy az angiogenezis szabályozásában fontos szerepet betöltő miR-27b mikroRNS szignifikáns emelkedéséhez vezet a megnövelt Wnt5a szint. Mivel a miR-27b részt vesz a PPARgamma mRNS destabilizálásában [94], gátolja a Wnt5a célpontjaként ismert NF-kappaB-t [108] és TGF-beta célmolekuláját a Gremlin-1-et [109], ezért a megváltozott expressziós szintje messzemenő molekuláris változásokat hozhat. Különösen, mivel a fent említett hatásokon túl a miR-27b részt vesz az angiogenezis során képződő erek elágazásainak és véredénnyé formálódásának a szabályozásában is [110]. Noha a másik mikroRNS, amely a véredények elágazását gátolja, a miR-200b [96] - a miR-27b-hez hasonlóan ugyan emelkedett szintet mutat az SCC mintákban, azonban nem a Wnt5a molekula szabályozása alatt áll.

Összességében elmondható, hogy a tüdő öregedése során a Wnt egyensúly megbomlik, amellyel együtt a VEGF-A szint is növekszik és hasonlóan változik, mint a tüdőben zajló karcinogénikus folyamatok során [51]. Mind a kanonikus, mind a nem-kanonikus Wnt molekulák eltérő molekuláris mechanizmusokon keresztül ugyan [111], de gátolni tudják a PPARgamma molekulát, amely megemelkedett VEGF-A expresszióhoz vezet. Mindazonáltal, az SCC tumoroknál látható nem-kanonikus útvonal, azon belül is a Wnt5a hangsúlyosabb jelenléte módosítja a VEGF-A endotélsejtekre gyakorolt hatását és a miR-27b expressziót (20. ábra), amely a tumor érhálózat elágazási zavaraihoz vezethet (33. ábra).



33. ábra: *Wnt5a* szerepe az AC és SCC tumorokban lezajló érképzésben.

A fenti eredmények tükrében arra következtethetünk, hogy a nem kissejtes tüdőtumorok esetén, ahol a normál szintnél magasabb a *Wnt5a* expresszió, nagyobb eséllyel alakul ki vérzéses mellékhatás anti-angiogenikus terápia következményeként, mivel az érképződés folyamatát, azon belül is az elágazódások kialakulását gátló molekuláris környezetet alakít ki az emelkedett *Wnt5a* szint. Az érhálózat elágazódásának gátlása fokozott nekrozist is okozhat. Ez utóbbi megállapítás viszont még további –zömmel retrospektív- vizsgálatok tárgyát képezi majd. Ennek fő oka, hogy ugyan a rezekált tüdőtumorokra jellemző a nekrozis [112], nem kissejtes tüdőrák altípusokra nem történtek vizsgálatok eddig. A szérumban lévő *Wnt5a* szint klinikai alkalmazása diagnosztikai területen és a terápia nyomon követésében betöltött lehetséges szerepével kapcsolatban jelenleg is folynak a kutatásaink.

6. Új eredmények, következtetések

Kutatómunkám során a következő kérdésekre kerestem választ:

- 1. Az érképzés folyamatában kiemelkedő szerepet játszó VEGF-A molekula megjelenése miként változik öregedés során és a különböző tüdődaganatokban, továbbá milyen szerepet játszik a megváltozott érhálózat kialakulásában?*

Az öregedés során megemelkedett VEGF-A és az endotélsejtek fokozott osztódására jellemző CD105 molekula is növekedett expressziót mutat. A jellemzően időskorban kialakuló nem kissejtes tüdőrák molekuláris állapota párhuzamot mutat az időskori mintákban megfigyelttel. A VEGF-A molekula emelkedett szintjével párhuzamosan egy másik molekula, a PPARgamma csökkent szintjét is kimutattuk. Az ellentétes irányú változást PPARgamma KO egérben is megfigyeltük, majd tüdőkarcinómákban is igazoltuk. Az emelkedett VEGF-A szint hatását in vitro 3D tüdőmodellen vizsgálva kimutattuk, hogy serkenti az endotélsejtek proliferációját és migrációját.

- 2. Befolyásolja-e a kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulák hatására megváltozott mikro környezet a PPARgamma expressziót? Amennyiben igen, milyen molekulák állhatnak az eltérő szabályozás hátterében?*

Mind AC, mind SCC esetében csökkent PPARgamma és emelkedett VEGF-A szint figyelhető meg, ami mindkét esetben az érképzés fokozódását jelenti. Az anti-angiogén kezelésre adott eltérő terápiás választ azonban nem elegendő csak ezzel a két molekulával magyarázni. A kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a PPARgamma mRNS és fehérjeszintjének a csökkenése beta-katenin, illetve kanonikus Wnt jelátvitel függő folyamat, melynek következtében emelkedik a VEGF-A molekula expressziós szintje, ami az AC mintákban megfigyelt molekuláris mintázatot magyarázza. Az SCC esetében mért csökkent PPARgamma és emelkedett VEGF-A szintet viszont nem, ugyanis ennél a tumortípusnál a nem-kanonikus Wnt útvonal van túlsúlyban. Az eltérő molekuláris szabályozás kérdésében az általunk vizsgált nem-kanonikus Wnt5a molekula lehet a magyarázat. A PPARgamma nem-kanonikus Wnt környezetben történő gátlásában a Wnt5a molekula és a miR-27b lehet a kulcs, ugyanis a Wnt5a képes a miR-27b aktiválására, amely a PPARgamma gátlásáért felelős.

3. A vizsgált Wnt molekulák milyen hatással vannak az endotélsejtek élettani folyamataira és szerepet játszanak-e a tüdő érhalózatának alakulásában nem kissejtes tüdőkarcinómák AC és SCC altípusainak esetében?

Az SCC altípusban túltermelt Wnt5a molekula egyéb szerepének vizsgálatában a kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a Wnt5a az endotélsejtek VEGF-A hatására megnövekedett proliferációját nem módosítja. A tumorigenezis folyamatában fontos szerepet játszó, a sejtek közti integritásért felelős kadherin molekulák szintjét viszont változtatni képes. Primer epitélsejtekben „kadherin-váltás”-hoz vezet, az E-kadherin szintjét csökkenti, míg az N-kadherin mRNS szintjét növeli. 3D tüdőmodellen végzett kísérleteink során szintén N-kadherin mRNS szint növekedést mértünk, míg a modellben szereplő endotélsejteket szorosabban érintő VE-kadherin szintje szintén emelkedett. A génexpressziós változások mellett a funkcionális vizsgálatok is igazolták azt a feltételezésünket, hogy a Wnt5a módosítani képes a VEGF-A indukálta folyamatokat. Primer epitélsejtek esetében a migrációs képességet fokozza, míg endotélsejtek esetében a VEGF-A indukálta migrációt csökkenti. Ez a megfigyelés az endotélsejtek szerepét hangsúlyozza, amely magyarázatot adhat az SCC altípusban megfigyelt sérülékeny érfalagnál tapasztaltakra.

7. Referenciák

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 59: 225–49. doi:10.3322/caac.20006
2. Korányi Bulletin [Internet]. Available: <http://www.koranyi.hu/index.php/koranyi-bulletin-9936>
3. Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2012;10: 1236–1271. Available: <http://www.jnccn.org/content/10/10/1236.full>
4. Tusnády G, Gaudi I, Rejto L, Kásler M, Szentirmay Z. [Survival chances of Hungarian cancer patients in the National Cancer Registry]. *Magy Onkol.* 2008;52: 339–49. doi:10.1556/MOnkol.52.2008.4.2
5. Jane-Wit D, Chun HJ. Mechanisms of Dysfunction in Senescent Pulmonary Endothelium. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2012;67A: 236–241. doi:10.1093/gerona/qlr248
6. Zagryazhskaya A, Zhivotovsky B. miRNAs in lung cancer: A link to aging. *Ageing Res Rev.* 2014;17: 54–67. doi:10.1016/j.arr.2014.02.009
7. Ramalingam SS, Dahlberg SE, Langer CJ, Gray R, Belani CP, Brahmer JR, et al. Outcomes for elderly, advanced-stage non small-cell lung cancer patients treated with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel: analysis of Eastern Cooperative Oncology Group Trial 4599. *J Clin Oncol.* 2008;26: 60–5. doi:10.1200/JCO.2007.13.1144
8. Brambilla E, Travis WD, Colby T V, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J.* 2001;18: 1059–68. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829087>
9. Paech DC, Weston AR, Pavlakakis N, Gill A, Rajan N, Barraclough H, et al. A systematic review of the interobserver variability for histology in the differentiation between squamous and nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6: 55–63. doi:10.1097/JTO.0b013e3181fc0878
10. Oliver TG, Patel J, Akerley W. Squamous non-small cell lung cancer as a distinct clinical entity. *Am J Clin Oncol.* 2015;38: 220–6. doi:10.1097/COC.0b013e3182a0e850
11. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest.* 2009;136: 260–71. doi:10.1378/chest.08-0978
12. Cascales A, Martinetti F, Belemsagha D, Le Pechoux C. Challenges in the treatment of early non-small cell lung cancer: what is the standard, what are the challenges and what is the future for radiotherapy? [Internet]. *Translational Lung*

Cancer Research. pp. 195–204. Available:
<http://www.tlcr.org/article/view/2942/3464>

13. Pignon J-P, Tribodet H, Scagliotti G V, Douillard J-Y, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008;26: 3552–9. doi:10.1200/JCO.2007.13.9030
14. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2008;26: 4617–25. doi:10.1200/JCO.2008.17.7162
15. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339: 1546–58. doi:10.1126/science.1235122
16. Cancer Genome Atlas Research Network TCGAR. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* NIH Public Access; 2012;489: 519–25. doi:10.1038/nature11404
17. El-Telbany A, Ma PC. Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? *Genes Cancer. Impact Journals, LLC;* 2012;3: 467–80. doi:10.1177/1947601912465177
18. Sgambato A, Casaluce F, Maione P, Rossi A, Ciardiello F, Gridelli C. Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown? *J Thorac Dis. AME Publications;* 2014;6: 578–80. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.06.14
19. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304: 1497–500. doi:10.1126/science.1099314
20. Cooper WA, Lam DCL, O’Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013;5 Suppl 5: S479–90. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03
21. Stinchcombe TE. Recent advances in the treatment of non-small cell and small cell lung cancer. *F1000Prime Rep.* 2014;6: 117. doi:10.12703/P6-117
22. Liao RG, Watanabe H, Meyerson M, Hammerman PS. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag.* 2012;1: 293–300. doi:10.2217/lmt.12.40
23. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 Kinase Gene Identify a Novel Therapeutic Target in Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2011;1: 78–89. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0005

24. Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, Mermel C, Cho J, Sharifnia T, et al. Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer. You M, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2011;6: e20351. doi:10.1371/journal.pone.0020351
25. Kojima H, Shijubo N, Abe S. Thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in patients with Stage I lung adenocarcinoma. *Cancer*. 2002;94: 1083–93. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920479>
26. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev*. 2001;100: 157–163. doi:10.1016/S0925-4773(00)00522-0
27. Zeng X, Wert SE, Federici R, Peters KG, Whitsett JA. VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev Dyn*. 1998;211: 215–27. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199803)211:3<215::AID-AJA3>3.0.CO;2-K
28. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004;56: 549–80. doi:10.1124/pr.56.4.3
29. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull*. 2011;34: 1785–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130231>
30. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25: 1–19. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.11.002
31. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol*. 2000;20: 7282–91. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Chouaib S, Messai Y, Couve S, Escudier B, Hasmim M, Noman MZ. Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Front Immunol*. 2012;3: 21. doi:10.3389/fimmu.2012.00021
33. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19: 329–37. doi:10.1016/j.semcancer.2009.05.003
34. Nagy JA, Chang S-H, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer*. *Cancer Research UK*; 2009;100: 865–9. doi:10.1038/sj.bjc.6604929
35. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285: 1182–6. doi:10.1056/NEJM197111182852108

36. Krämer I, Lipp H-P. Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *J Clin Pharm Ther.* Blackwell Publishing Ltd; 2007;32: 1–14. doi:10.1111/j.1365-2710.2007.00800.x
37. Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R. Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer. *Drugs.* 2014;74: 403–13. doi:10.1007/s40265-014-0182-z
38. Gridelli C, Maione P, Rossi A, De Marinis F. The role of bevacizumab in the treatment of non-small cell lung cancer: current indications and future developments. *Oncologist.* 2007;12: 1183–93. doi:10.1634/theoncologist.12-10-1183
39. Prager GW, Poettler M, Unseld M, Zielinski CC. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. *Transl lung cancer Res.* 2012;1: 14–25. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2011.11.02
40. Dagnon K, Heudes D, Bernaudin J-F, Callard P. Computerized morphometric analysis of microvasculature in non-small cell lung carcinoma. *Microvasc Res.* 2008;75: 112–8. doi:10.1016/j.mvr.2007.04.004
41. Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, et al. Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2013;44: 1586–96. doi:10.1016/j.humpath.2013.01.004
42. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2007;96: 1788–95. doi:10.1038/sj.bjc.6603813
43. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis.* 2014;17: 471–94. doi:10.1007/s10456-014-9420-y
44. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347: 645–650. doi:10.1038/347645a0
45. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer.* 2004;4: 61–70. doi:10.1038/nrc1254
46. Simon DM, Arian MC, Srisuma S, Bhattacharya S, Tsai LW, Ingenito EP, et al. Epithelial cell PPAR[gamma] contributes to normal lung maturation. *FASEB J.* 2006;20: 1507–9. doi:10.1096/fj.05-5410fje
47. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 1992;68: 879–87. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312391>
48. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome

- proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91: 7355–9.
Available:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44398&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Wang D, Dubois RN. Peroxisome proliferator-activated receptors and progression of colorectal cancer. *PPAR Res*. 2008;2008: 931074.
doi:10.1155/2008/931074
 50. Gan Q, Huang J, Zhou R, Niu J, Zhu X, Wang J, et al. PPAR{gamma} accelerates cellular senescence by inducing p16INK4{alpha} expression in human diploid fibroblasts. *J Cell Sci*. 2008;121: 2235–45.
doi:10.1242/jcs.026633
 51. Kovacs T, Csongei V, Feller D, Ernszt D, Smuk G, Sarosi V, et al. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell*. 2014;13: 838–49. doi:10.1111/accel.12240
 52. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2007;1771: 926–935.
doi:10.1016/j.bbalip.2007.02.013
 53. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*. 1998;1: 465–70. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660931>
 54. Bren-Mattison Y, Van Putten V, Chan D, Winn R, Geraci MW, Nemenoff RA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR(gamma)) inhibits tumorigenesis by reversing the undifferentiated phenotype of metastatic non-small-cell lung cancer cells (NSCLC). *Oncogene*. 2005;24: 1412–22.
doi:10.1038/sj.onc.1208333
 55. Wang AC, Dai X, Luu B, Conrad DJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24: 688–93. doi:10.1165/ajrcmb.24.6.4376
 56. Larsen TM, Toubro S, Astrup A. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes*. Nature Publishing Group; 2003;27: 147–161. doi:10.1038/sj.ijo.802223
 57. Pelton P. GW-501516 GlaxoSmithKline/Ligand. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7: 360–70. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625823>
 58. Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, et al. Activation of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor (PPAR)δ Promotes Reversal of Multiple Metabolic Abnormalities, Reduces Oxidative Stress, and Increases Fatty Acid Oxidation in Moderately Obese Men. *Diabetes*. 2008;57.
 59. Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-

- alcoholic fatty liver disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15: 493–503. doi:10.1517/14656566.2014.876992
60. Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ. Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis*. 1997;18: 2029–33. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395198>
 61. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med*. 1998;4: 1053–7. doi:10.1038/2036
 62. Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2003;6: 165–9. doi:10.1023/B:AGEN.0000021377.13669.c0
 63. Peeters LLH, Vigne J-L, Tee MK, Zhao D, Waite LL, Taylor RN. PPAR gamma represses VEGF expression in human endometrial cells: implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis*. 2005;8: 373–9. doi:10.1007/s10456-005-9027-4
 64. Chintalgattu V, Harris GS, Akula SM, Katwa LC. PPAR-gamma agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;74: 140–50. doi:10.1016/j.cardiores.2007.01.010
 65. Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G. WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br J Pharmacol*. 2014;171: 1195–1209. doi:10.1111/bph.12364
 66. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106: djt356. doi:10.1093/jnci/djt356
 67. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett*. 2005;222: 1–10. doi:10.1016/j.canlet.2004.08.040
 68. Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*. 2010;106: 1798–806. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219840
 69. Vaughan AE, Halbert CL, Wootton SK, Miller AD. Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells, but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation. *Mol Cancer Res*. 2012;10: 86–95. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0285
 70. Pacheco-Pinedo EC, Durham AC, Stewart KM, Goss AM, Lu MM, Demayo FJ, et al. Wnt/β-catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium. *J Clin Invest*. 2011;121: 1935–45. doi:10.1172/JCI44871

71. Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, Kovacs T, et al. Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. *PLoS One*. 2013;8: e57393. doi:10.1371/journal.pone.0057393
72. Lorenowicz MJ, Korswagen HC. Sailing with the Wnt: charting the Wnt processing and secretion route. *Exp Cell Res*. 2009;315: 2683–9. doi:10.1016/j.yexcr.2009.06.015
73. Wang Y-L, Yao W-J, Guo L, Xi H-F, Li S-Y, Wang Z-M. Expression of flotillin-2 in human non-small cell lung cancer and its correlation with tumor progression and patient survival. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8: 601–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755751>
74. Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*. 2005;14: 1583–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273260>
75. Yang D-H, Yoon J-Y, Lee S-H, Bryja V, Andersson ER, Arenas E, et al. Wnt5a is required for endothelial differentiation of embryonic stem cells and vascularization via pathways involving both Wnt/beta-catenin and protein kinase Calpha. *Circ Res*. 2009;104: 372–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.185405
76. Le Bras A, Vijayaraj P, Oettgen P. Molecular mechanisms of endothelial differentiation. *Vasc Med*. 2010;15: 321–331. doi:10.1177/1358863X10371685
77. Goodwin AM, Sullivan KM, D'Amore PA. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Dev Dyn*. 2006;235: 3110–20. doi:10.1002/dvdy.20939
78. Masckauchán TNH, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li C-M, et al. Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2. *Mol Biol Cell*. 2006;17: 5163–72. doi:10.1091/mbc.E06-04-0320
79. Cheng C, Yeh J, Fan T-P, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365: 285–290. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.166
80. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 2001;61: 6050–4. Available: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/16/6050.abstract>
81. Ekström EJ, Bergenfelz C, von Bülow V, Serifler F, Carlemalm E, Jönsson G, et al. WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol Cancer*. 2014;13: 88. doi:10.1186/1476-4598-13-88

82. Yao L, Sun B, Zhao X, Zhao X, Gu Q, Dong X, et al. Overexpression of Wnt5a promotes angiogenesis in NSCLC. *Biomed Res Int.* 2014;2014: 832562. doi:10.1155/2014/832562
83. Huang C-L, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, et al. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23: 8765–73. doi:10.1200/JCO.2005.02.2871
84. Bovia F. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood.* 2002;101: 1727–1733. doi:10.1182/blood-2001-12-0249
85. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan C-W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol.* NIH Public Access; 2009;5: 100–7. doi:10.1038/nchembio.137
86. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93: 8455–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710892>
87. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9: 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
88. Rivard A, Andrés V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol.* 2000;15: 557–71. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10809377>
89. Petrucci G, Verratti V, Antosiewicz J, Cataldi A, Mazzatenta A, Di Giulio C. Reduced pulmonary function is age-dependent in the rat lung in normoxia. *Eur J Med Res.* 2010;15 Suppl 2: 108–11. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4360264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
90. Slusarski DC, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol.* NIH Public Access; 2007;307: 1–13. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.043
91. McGregor RA, Choi MS. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr Mol Med.* 2011;11: 304–16. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3267163&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
92. Suárez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res.* 2009;104: 442–54. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.191270

93. Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther. Landes Bioscience*; 2010;10: 219–22. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592490>
94. Jennewein C, von Knethen A, Schmid T, Brüne B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *J Biol Chem.* 2010;285: 11846–53. doi:10.1074/jbc.M109.066399
95. Veliceasa D, Biyashev D, Qin G, Misener S, Mackie AR, Kishore R, et al. Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b. *Vasc Cell.* 2015;7: 6. doi:10.1186/s13221-015-0031-1
96. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2011;60: 1314–23. doi:10.2337/db10-1557
97. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009;1: a003129. doi:10.1101/cshperspect.a003129
98. Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol.* 2009;106: 326–32. doi:10.1152/jappphysiol.91353.2008
99. Berger NA, Savvides P, Koroukian SM, Kahana EF, Deimling GT, Rose JH, et al. Cancer in the elderly. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2006;117: 147–55; discussion 155–6. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1500929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
100. Schmidinger M, Bellmunt J. Plethora of agents, plethora of targets, plethora of side effects in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2010;36: 416–24. doi:10.1016/j.ctrv.2010.01.003
101. Reck M, Barlesi F, Crinò L, Henschke CI, Isla D, Stiebeler S, et al. Predicting and managing the risk of pulmonary haemorrhage in patients with NSCLC treated with bevacizumab: a consensus report from a panel of experts. *Ann Oncol.* 2012;23: 1111–20. doi:10.1093/annonc/mdr463
102. Berge EM, Doebele RC. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: emerging oncogene targets following the success of epidermal growth factor receptor. *Semin Oncol.* 2014;41: 110–25. doi:10.1053/j.seminoncol.2013.12.006
103. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274: 9116–21. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085162>

104. Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Romero M, Quintela AM, López-Sepúlveda R, et al. Endothelium-dependent vasodilator effects of peroxisome proliferator-activated receptor beta agonists via the phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332: 554–61. doi:10.1124/jpet.109.159806
105. Keshamouni VG, Arenberg DA, Reddy RC, Newstead MJ, Anthwal S, Standiford TJ. PPAR-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia.* 2005;7: 294–301. doi:10.1593/neo.04601
106. Theocharis S, Kanelli H, Politi E, Margeli A, Karkandaris C, Philippides T, et al. Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma in non-small cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Lung Cancer.* 2002;36: 249–55. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009233>
107. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Dev Cell.* 2013;26: 441–454. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020
108. Thulasigam S, Massilamany C, Gangaplara A, Dai H, Yarbaeva S, Subramaniam S, et al. miR-27b*, an oxidative stress-responsive microRNA modulates nuclear factor-kB pathway in RAW 264.7 cells. *Mol Cell Biochem.* 2011;352: 181–8. doi:10.1007/s11010-011-0752-2
109. Graham JR, Williams CMM, Yang Z. MicroRNA-27b targets gremlin 1 to modulate fibrotic responses in pulmonary cells. *J Cell Biochem.* 2014;115: 1539–48. doi:10.1002/jcb.24809
110. Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL, Janknecht R, Dooley WC, Ding W-Q. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol Cancer.* 2015;14: 133. doi:10.1186/s12943-015-0400-7
111. Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir Res.* 2006;7: 15. doi:10.1186/1465-9921-7-15
112. Gkogkou C, Frangia K, Saif MW, Trigidou R, Syrigos K. Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *Springerplus.* 2014;3: 120. doi:10.1186/2193-1801-3-120

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **J. Rapp**, E. Kiss, M. Meggyes, E. Szabo-Meleg, D. Feller, G. Smuk, T. Laszlo, V. Sarosi, T. F. Molnar, K. Kvell, and J. E. Pongracz, "Increased Wnt5a in squamous cell lung carcinoma inhibits endothelial cell motility," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 915 (2016). IF: **3,265**
2. D. Bartis, V. Csongei, A. Weich, E. Kiss, S. Barko, T. Kovacs, M. Avdicevic, V. K. D'Souza, **J. Rapp**, K. Kvell, L. Jakab, M. Nyitrai, T. F. Molnar, D. R. Thickett, T. Laszlo, and J. E. Pongracz, "Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma.," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e57393 (2013). IF: 3,534. A dolgozatban a cikk eredményei részben kerültek felhasználásra, ennek megfelelően az impakt faktorok megállapításánál **1,767** került beszámításra.

Összesített impakt faktor: 5,032

9. Kongresszusi előadások jegyzéke

1. **Judit Rapp**, Veronika Csöngői, Tamás Kovács, Monika Avdicevic, Edit Kiss, Krisztián Kvell, Judit E. Pongrácz: Induction of in vivo vascularization of in vitro engineered lung tissues – a novel therapeutic approach in lung regeneration. 9th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Kralove, Czech Republic, 2012. November 22-24.
2. **Rapp Judit**, Csöngői Veronika, Kovács Tamás, Avdicevic Monika, Kiss Edit, Kvell Krisztián, Pongrácz E. Judit: In vitro előállított tüdőszövet érhálózatának kialakítása in vivo körülmények között. 43. Membrán- Transzport Konferencia, Sümeg, 2013. Május 21-24. (Előadásra kiválasztott poszter)
3. Veronika Sárosi, **Judit Rapp**, Tamás Kovács, Diána Feller, Gábor Smuk, Judit E. Pongracz: Regulation of angiogenesis by Wnt signaling in non-small cell lung cancer. 9th International Conference of Anticancer Research, Greece, Porto Carras, Sithonia, 2014. Október 6-10.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítettek a dolgozatom elkészítését az elmúlt évek során.

Elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Pongrácz Juditnak szeretnék köszönetet mondani, hogy annak idején csatlakozhattam a Wnt jelátviteli kutatócsoportjához. Hálás vagyok, hogy mindvégig támogatott és szakmai tanácsaival, útmutatásaival segítségemre volt az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészi Biotechnológia Tanszék minden munkatársának, különösképpen Feller Diának és Kiss Editnek, hogy munkatársként és barátként segítettek az évek során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Molnár F. Tamásnak, Dr. Sárosi Veronikának, Dr. László Teréziának és Dr. Smuk Gábornak a klinikai mintagyűjtésben és a szükséges beteganyagok kiválasztásában nyújtott segítségükért, valamint a kapott eredmények szakszerű értékeléséhez nyújtott hasznos tanácsaikért.

Köszönet illeti a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Immunológiai és Biotechnológia Intézetének minden dolgozóját, akik szakmai tapasztalatukkal segítettek a tanulmányaim során.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak, amiért lehetőséget biztosított számomra a konfokális mikroszkóp használatához, valamint Dr. Szabó-Meleg Edinának, aki szakmai útmutatásával nagyban elősegítette a mikroszkópos kísérletek sikeres kivitelezését.

Végül, de nem utolsó sorban külön köszönettel tartozom családomnak és páromnak, akik mindvégig mellettem álltak, támogattak a tanulmányaim alatt és bíztattak az elmúlt évek során.

11. Mellékletek

1. **J. Rapp**, E. Kiss, M. Meggyes, E. Szabo-Meleg, D. Feller, G. Smuk, T. Laszlo, V. Sarosi, T. F. Molnar, K. Kvell, and J. E. Pongracz, “Increased Wnt5a in squamous cell lung carcinoma inhibits endothelial cell motility,” *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 915 (2016).
2. D. Bartis, V. Csongei, A. Weich, E. Kiss, S. Barko, T. Kovacs, M. Avdicevic, V. K. D’Souza, **J. Rapp**, K. Kvell, L. Jakab, M. Nyitrai, T. F. Molnar, D. R. Thickett, T. Laszlo, and J. E. Pongracz, “Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e57393 (2013).

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Increased Wnt5a in squamous cell lung carcinoma inhibits endothelial cell motility

J. Rapp^{1,7,9}, E. Kiss^{1,7,9}, M. Meggyes^{2,9}, E. Szabo-Meleg^{3,7}, D. Feller^{1,7,9}, G. Smuk⁴, T. Laszlo⁴, V. Sarosi⁵, T. F. Molnar^{6,8}, K. Kvell^{1,7} and J. E. Pongracz^{1,7,9*}

Abstract

Background: Angiogenesis is important both in normal tissue function and disease and represents a key target in lung cancer (LC) therapy. Unfortunately, the two main subtypes of non-small-cell lung cancers (NSCLC) namely, adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC) respond differently to anti-angiogenic e.g. anti-vascular endothelial growth factor (VEGF)-A treatment with life-threatening side effects, often pulmonary hemorrhage in SCC. The mechanisms behind such adverse reactions are still largely unknown, although peroxisome proliferator activator receptor (PPAR) gamma as well as Wnt-s have been named as molecular regulators of the process. As the Wnt microenvironments in NSCLC subtypes are drastically different, we hypothesized that the particularly high levels of non-canonical Wnt5a in SCC might be responsible for alterations in blood vessel growth and result in serious adverse reactions.

Methods: PPARgamma, VEGF-A, Wnt5a, miR-27b and miR-200b levels were determined in resected adenocarcinoma and squamous cell carcinoma samples by qRT-PCR and TaqMan microRNA assay. The role of PPARgamma in VEGF-A expression, and the role of Wnts in overall regulation was investigated using PPARgamma knock-out mice, cancer cell lines and fully human, in vitro 3 dimensional (3D), distal lung tissue aggregates. PPARgamma mRNA and protein levels were tested by qRT-PCR and immunohistochemistry, respectively. PPARgamma activity was measured by a PPRE reporter system. The tissue engineered lung tissues expressing basal level and lentivirally delivered VEGF-A were treated with recombinant Wnts, chemical Wnt pathway modifiers, and were subjected to PPARgamma agonist and antagonist treatment.

Results: PPARgamma down-regulation and VEGF-A up-regulation are characteristic to both AC and SCC. Increased VEGF-A levels are under direct control of PPARgamma. PPARgamma levels and activity, however, are under Wnt control. Imbalance of both canonical (in AC) and non-canonical (in SCC) Wnts leads to PPARgamma down-regulation. While canonical Wnts down-regulate PPARgamma directly, non-canonical Wnt5a increases miR27b that is known regulator of PPARgamma.

Conclusion: During carcinogenesis the Wnt microenvironment alters, which can downregulate PPARgamma leading to increased VEGF-A expression. Differences in the Wnt microenvironment in AC and SCC of NSCLC lead to PPARgamma decrease via mechanisms that differentially alter endothelial cell motility and branching which in turn can influence therapeutic response.

Keywords: Lung cancer, NSCLC, Angiogenesis, Wnt, PPARgamma

* Correspondence: pongracz.e.judit@pte.hu

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, University of Pécs, 2 Rokos Str, Pécs 7624, Hungary

⁷János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, 20 Ifjúság Str, Pécs 7622, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Lung cancer (LC) with disappointing survival statistics is a leading cause of morbidity in both genders worldwide [1, 2]. The two main types of LC-s are small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) where the latter can be further classified into adeno- (AC), squamous cell- (SCC), large cell (LCC) and various mixed types carcinomas accounting all together for approximately 85% of all LC cases [3]. As the majority of patients are diagnosed at an advanced stage of the disease, the outcome is poor and the overall 5-year survival rarely exceeds 15% [4]. Naturally, earlier recognition would improve the outcome, but currently only a few treatment options are available to lung cancer sufferers [5] and the more specific treatments are largely based on identified driver mutations [6]. Unfortunately, only a small percentage of NSCLC patients have such characteristic mutations therefore the majority cannot benefit from targeted therapy [7]. Recognition that new blood vessel formation is important to tumor growth lead to development of angiogenesis inhibitors [8] to block tumor growth and disease progression. The first monoclonal antibody –bevacizumab– was approved against the human vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) a key regulator of angiogenesis [9]. As VEGF-A promotes endothelial cell survival, migration, proliferation and vascular permeability it appeared an ideal target to “starve” the tumor and lead to tumor regression. Although VEGF-A is the main signaling molecule in pathological angiogenesis and is upregulated in many tumors [10] including in NSCLC-s [11] success of anti-angiogenic therapy in human cancers remained far from impressive.

Despite some positive results using bevacizumab mostly in combination therapy [12], patients mainly with squamous histology were excluded from treatment as increased risk of fatal side effects were observed [13]. The reasons for limited responsiveness or increased hemorrhage are still unknown, but several ideas have come to light. For example, the two types of NSCLC-s not only differ in genomic mutations [14], but AC and SCC also possess different intra-tumoral blood vessel formations. Kojima et al. have reported that microvessel density is higher in AC than SCC [15], while Yazdani et al. have hypothesized that intratumoral vessels are less covered by pericytes in SCC than AC, leading to more vulnerable and fragile vascular wall with increased necrosis in newly formed vessels in SCC [16]. As alternative signaling pathways, such as basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet derived growth factor (PDGF) as well as miRNAs, especially the pro-angiogenic miR-27b and the miR-200 family [17, 18] also play a significant

role in the regulation of angiogenesis; solely blocking VEGF-A simply cannot provide a therapeutic solution in NSCLCs [19]. Additionally, the underlying signaling mechanisms have not been fully elucidated that would also be essential to stratify the patient population subjected to anti-angiogenic therapies.

One of the controversial regulators of VEGF-A is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) that has been reported to inhibit endothelial cell function [20] and vasodilatation [21]. According to the growing literature, PPARgamma can either activate or inhibit VEGF-A mediated endothelial cell response [22] depending on the modulatory effect of the surrounding molecular microenvironment [23]. Investigation of molecular interactions revealed that PPARgamma expression in the presence of PDGF results in good prognosis, whereas bFGF diminishes the positive role of PPARgamma in tumor recurrence [24]. PPARgamma regulates endoglin (CD105) [25] that is a VEGF-A induced endothelial cell proliferation marker [26] but is also responsible for the vascular tone [27]. As PPARgamma regulates nitric oxide synthase activity [28] it is also an important protein in vasorelaxation [29].

Interestingly, both PPARgamma [30, 31] and VEGF-A have been reported to be under Wnt control [32]. The Wnt family of secreted glyco-lipo-proteins control a wide variety of cellular processes including cell fate specification, cell proliferation, cell polarity and cell migration and are therefore important in both fetal development and carcinogenesis [33, 34]. Depending on the initial trigger one of the three main Wnt pathways are activated. Two non-canonical pathways including the Ca²⁺ and the planar cell polarity (PCP) pathways or the beta-catenin dependent canonical pathway [35]. Activation or mutation of molecules regulating Wnt signaling have been reported in many cancer types although mutations in NSCLC-s are rare [36]. As canonical and non-canonical Wnt pathways are differentially active in AC and SCC [37], we considered the possibility that differences in the Wnt microenvironment may be partly responsible for variations in the tumor angiogenic processes and therapeutic response. Especially, as Wnt-s, particularly the non-canonical Wnt5a, also regulate endothelial cell division, survival and migration [38] strengthening the hypothesis that angiogenesis is under Wnt control [32].

In the present study, we focused our attention on Wnt5a and PPARgamma to have a better insight into the regulation of angiogenesis in AC and SCC. Wnt5a was specifically selected as its up-regulation is characteristic to SCC tumors distinguishing the tumor microenvironment of SCC from AC [37]. We theorized that upregulation of non-canonical Wnt-s in

SCC might also be responsible for alterations in blood vessel formation leading to more severe side effects to anti-VEGF therapies.

Methods

Ethical statement

All collected samples were treated anonymously. All patients were diagnosed with NSCLC, 23 of adenocarcinoma and 16 of squamous cell carcinoma. Patient characteristics are shown in Additional file 1: Table S1.

Animals

Lungs were used from wild-type, PPARgamma^{+/-} heterozygous and PPARgamma^{-/-} KO mice of C57BL/6 J genetic background. The design to generate viable PPARgamma null mice was described previously [39]. Briefly, PPARgamma^{+/-} / Sox2Cre + male mice were crossed with PPARgamma^{fl/fl} female mice to generate heterozygous PPARgamma^{fl/-} / Sox2Cre and homozygous PPAR gamma^{Δfl/-} / Sox2Cre + mice, wherein the floxed allele was recombined resulting in a null allele. Genotypes were determined by PCR using primers for Cre transgene, PPARgamma upstream loxP site and for the null allele. Mice were housed under minimal disease (MD) conditions. PPARgamma KO or heterozygous mice and their controls were kept in the Laboratory Animal Core Facility of the University of Debrecen that is registered to breed genetically-modified mouse strains (reg. no.: TMF/82-10/2015). 3–3 animals from the control and the PPARgamma KO group were sacrificed at the age of 3.5 months.

Cell lines and primary cells

Human hTERT-immortalized primary human foreskin fibroblast cell line (F11, System bioscience Mountain View, CA, USA) and human lung adenocarcinoma A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) cell line were used for the experiments. VEGF-A overexpressing F11 cell line was generated in our laboratory using lentiviral transfection (see below). Normal primary human small airway epithelial cells (SAEC), normal human lung fibroblast (NHLF) and human microvascular lung endothelial cells (HMVEC-L) were purchased from Lonza (Basel, Switzerland), isolated from anonymous donors of different ages and sex. F11 cells were used in experiments between passage numbers 2 to 5 and the cells were negative for cytokeratin. A549 cells were used between passage number 8 to 10 and epithelial characteristics were proved by cytokeratin positivity. All the cell cultures were regularly tested for mycoplasma infection [40].

Cell cultures

F11 and normal human lung fibroblast (NHLF) cells were cultured at 37 °C, 5% CO₂ in Fibroblast Growth Medium-2 (FGM-2) (Lonza, Basel, Switzerland). Small airway epithelial cell (SAEC) and human lung microvascular endothelial cell (HMVEC-L) cells were maintained at the same condition using small airway growth medium (SAGM) and endothelial growth medium (EGM-2 MV), according to the manufacturer's recommendation (Lonza, Basel, Switzerland).

Materials

Beta-catenin activator LiCl was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) and used in 10 mM concentration [41]. Purified, recombinant human Wnt5a and Wnt11 (Chinese Hamster Ovary Cell Line, CHO-derived Gln38-Lys380) protein was purchased from R&D Systems (Minneapolis, USA) and used at a concentration of 1 μg/ml [37]. PPARgamma agonist rosiglitazone (RSG) and antagonist GW9662 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and used at 10 μM concentrations each [42, 43]. During the experiments, A549 and F11 cells were treated with 10 mM LiCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 μM RSG and 10 μM GW9662 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for 48 h.

Three dimensional lung tissues [44]

To create a fully human 3D lung tissue model, SAEC, NHLF and HMVEC-L cells were used. All cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in primary cell culturing media. After the cells reached 80% confluence, all cell types were subcultured and mixed [30% SAEC, 30% HMVEC-L and 40% NHLF] then dispensed onto a low-attachment 96-well U-bottom plate (Corning, New York, USA). Cells were centrifuged at 600 g for 10min and maintained at 37 °C and 5% CO₂ in mixed SAGM:EGM-2:FGM-2 media during the experiments. In the various experiments, aggregates were treated with 1 μg/ml recombinant human Wnt5a and Wnt11 (R&D Systems, Minneapolis, USA) for 72 h.

Recombinant Lenti (L) viral constructs and hF11 transfection of VEGF-A-GFP construct

VEGF-A sequence was amplified by PCR reaction using forward (5')'- GGA TTC CTG ACG GAC AGA CAG ACA GAC-3' and reverse (3')'- GTC GAC TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA-3' primer sequences and cloned into Lenti pWPTS vectors. Lentiviral vectors were prepared by co-transfection of three plasmid constructs (envelope construct pMD.G, packaging construct R8.91 and transfer construct pWPTS) into 293 T cells using the calcium-phosphate method as described previously [45]. The HIV-1 derived lentiviral system was

kindly provided by Prof. Didier Trono (CMU, Geneva, Switzerland).

Cells were maintained in FGM-2 medium and exposed to lentivirus containing media for 1 h, and then cells were washed and incubated in FGM-2 culturing media. VEGF-A overexpressing F11 cells were then harvested and spheroids were produced as described above. SAEC-F11 VEGF^{high}- HMVEC-L and SAEC-F11-HMVEC-L aggregates were cultured for an additional 72 h before RNA isolation or immunofluorescent analysis. Aggregates were exposed to recombinant human Wnt5a and recombinant human Wnt11 (Chinese Hamster Ovary Cell Line, CHO-derived Gln38-Lys380) (R&D Systems, Minneapolis, USA) for 72 h.

Flow cytometry

3D SAEC-F11 VEGF^{high}- HMVEC-L and SAEC-F11-HMVEC-L lung aggregates were cultured for 72 h in the presence or absence of rhWnt5a. Aggregates were then dissociated with AccumaxTM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) solution and washed in PBS once. Single cell suspensions were incubated with Allophycocyanin (APC) conjugated anti-human CD105 (Clone 43A3, BioLegend, San Diego, USA) and Brilliant Violet 421 conjugated anti-human CD31 (Clone VM59, BioLegend, San Diego, USA) for 30min at room temperature in dark. Native lung AC and SCC samples were dissociated by enzymatic digestion (Accumax Solution, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and the single cell suspensions were washed in PBS once, then cells were incubated with APC Cy7 conjugated anti-human CD31 (Clone VM59, BioLegend, San Diego, USA) and APC conjugated CD105 (Clone 43A3, BioLegend, San Diego, USA) antibodies. Cells then were washed in PBS, fixed with 1% PFA and stored at 4 °C in dark until FACS analysis. Labeled cells were analyzed using FACS Canto II flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) with BD FACS DIVA software V6 and data were analyzed by FCS Express V3 software.

3D sprouting

3D SAEC-F11 VEGF^{high}- HMVEC-L and SAEC-F11-HMVEC-L lung aggregates were embedded in 1.5 mg/ml collagen type I solution (BD Biosciences, San Jose, USA) and were cultured for 72 h. Images were taken using Zeiss LSM710 confocal microscope. To identify the migrating cell type; epithelial and endothelial cells were previously cultured with the vital dyes DiD and DiI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), respectively, while fibroblast cells remained unstained. Sprouting area containing endothelial cells was determined by Fiji [46], based on the sprout outgrowth.

PPRE reporter assay

A549 cells were transfected with PPRE-luciferase reporter and PPRE control-luciferase reporter vectors using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). 6×10^3 cells were transfected with 100 ng of plasmid DNA mixed with 0.3 μ l Lipofectamine 3000 and 0.2 μ l P3000 reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). After overnight incubation, cells were treated with LiCl at 10 mM concentration for 24 h. Luciferase reporter, containing PPRE responsive element can be activated by PPAR activation, which catalyzes luciferin oxyluciferin transformation into luminescent signal. PPAR activation was measured using BrightGlo luciferase assay (Promega, Madison, USA) and detected by Synergy HT plate reader (BioTek, Winooski, USA). Changes in PPAR activation were compared to PPRE control plasmid. RNA isolation was performed after 24 h treatment. Gene expression was compared to non-treated cell cultures. Immunofluorescent staining was performed using purified anti-human VEGF-A antibody (1:100, Clone 26503, R&D Systems, Minneapolis, USA) as primary antibody, visualized by Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse secondary IgG antibody (1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Nuclei were stained by TO-PRO3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and pseudo-colored for blue. Pictures were taken by Zeiss LSM 710.

PPARgamma agonist and antagonist treatment

F11 cell line was cultured in 24-well plate and was treated with 10 μ M rosiglitazone (RSG) and 10 μ M GW9662 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 48 h in the presence or absence of rhWnt5a (R&D Systems, Minneapolis, USA). VEGF-A mRNA level was determined using real-time quantitative PCR, while miR-27b expression was measured by Taqman MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

HMVEC-L transwell migration assay

HMVEC-L cells were seeded onto the Transwell insert (8 μ m pore size, 6.5 mm diameter) (Corning Costar, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) at the density of 2×10^4 . To assess the effect of VEGF-A and Wnt5a, HMVEC-L were cultured in the presence or absence of elevated level of VEGF-A and recombinant human Wnt5a. To gain VEGF-A excess, F11-VEGF^{high} cells were seeded into the well. F11-VEGF^{normal} cells were used as controls. After 24 h, the inserts were stained with Hematoxylin-eosin (detailed protocol below) and pictures were taken using Nikon Eclipse Ti-U inverted microscope (Tokyo, Japan).

RNA isolation

Total RNA from cell cultures was extracted with MN NucleoSpin RNA isolation kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The concentration of RNA samples was measured using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Total RNA from human lung tissues were obtained using TRIzol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). 1 µg RNA were digested with DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Real-time quantitative PCR

cDNA was synthesized with high capacity RNA to cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) using 1 µg of total RNA according to manufacturer's recommendation. Reverse transcription was performed with random hexamer primers. For gene expression analysis, quantitative RT-PCR was performed using SensiFAST SYBR Green reagent (BioLine, London, UK). Amplifications were run on ABI StepOnePlus system. Gene expressions were analyzed with StepOne software and normalized to beta-actin housekeeping gene. The primer sequences are shown in Table 1. PCR conditions were set as follows: one cycle 95 °C for 2min, 40 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. Changes in gene expression were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

TaqMan microRNA assay

Reverse transcription reaction was set up with ABI TaqMan microRNA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) using 100 ng of total RNA according to manufacturer's recommendations. Each reaction contains specific miR-27b, miR-200b and U6 primers. PCR reaction was performed using TaqMan MicroRNA Assay (20x), TaqMan Universal Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and product from reverse transcriptase reaction. TaqMan PCR reaction was performed using ABI StepOnePlus system and data were analyzed with StepOne software. PCR conditions set as follows: one cycle 95 °C for 10min, 40 cycles at 95 °C for

15 s and 60 °C for 60 s. MicroRNA expression was normalized to U6 expression.

Sections

Mice were anaesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally and lungs were filled up with 1:1 ratio of PBS:cryostate embedding media (TissueTek, Alphen aan den Rijn, Netherland), and frozen down at -80 °C. Human samples were collected in PBS containing 1% of FBS and then were filled up with PBS:cryostate embedding media and kept at -80 °C until processing. The 3D lung aggregates were carefully removed from the 96-well plates and embedded into TissueTek embedding media and immediately frozen down at -80 °C. For histological staining 8 µm thick cryostat sections were cut and fixed in 4% PFA for 20min.

Hematoxylin eosin staining

Eight micrometers thick cryostat sections or Transwell inserts (Corning, New York, USA) were cut and stained in Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 10min. Sections were washed in running tap water for 10min, then differentiated with 0.25% acetic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 1min. After the differentiation step, slides were washed with tap water and stained in eosin solution for 2min, then washed. Sections were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Images were taken using Nikon Eclipse Ti-U inverted microscope (Tokyo, Japan).

Antibodies, fluorescent and immunohistochemical staining

Paraffin embedded lung AC and SCC samples were stained with a routine IHC staining procedure using Vision Biosystems bondTM automated immunostainer (Leica, Wetzlar, Germany). Primary antibody of rat monoclonal anti-human Wnt5a (Clone 442625, R&D Systems, Minneapolis, USA) was used in 1:100 dilution. Cryostat sections were fixed. Fixed slides were rehydrated and blocked for 20min in 5% BSA (Sigma

Table 1 Quantitative real-time PCR primers

Primers	Forward	Reverse
beta-actin	GCGCGGCTACAGCTTCA	CTTAATGTCACGCACGATTTC
PPARgamma	GCTTTGGCATACTCTGTGATCTC	GGTGGCCATCCGCATCT
VEGF-A	GGGCAGAATCATCACGAAGT	TGGTGATGTTGGACTCCTCA
CD105	CTCTCCAGGCATCCAAGCAA	CAGGCTGGAATTGTAGGCCA
CD31	GCTGACCCCTTCTGCTCTGTT	ATCTGGTGCTGAGGCTTGAC
HIF-1alpha	GCCAGACGATCATGCAGCTA	ATCCATTGATTGCCCCAGC
IL-1beta	TCAGCCAATCTTCATTGCTCAA	TGGCGAGCTCAGGTACTTCTG
Wnt5a	CAAAGCAACTCTGGGCTTA	CCTGCTCTGACCGTCC

Aldrich, St. Louis, USA) in PBS. For mouse sections, Alexa Fluor 594 conjugated monoclonal anti-mouse CD31 (1:100, Clone MEC13.3, BioLegend, San Diego, USA), Alexa Fluor 488 conjugated monoclonal anti-mouse CD105 (1:100, Clone MJ7/18, BioLegend, San Diego, USA), purified monoclonal anti-mouse VEGF-A (1:100, Clone 1 F07-2C01, BioLegend, San Diego, USA) and purified monoclonal anti-mouse Wnt5a (1:50, Clone 442625, R&D Systems, Minneapolis, USA) primary antibodies were applied. For 3D lung tissue samples, the sections were stained with purified monoclonal anti-human CD31 antibody (1:100, Clone WM59, BioLegend, San Diego, USA). To detect VEGF-A expression in A549 and F11 cell line, purified monoclonal anti-human VEGF-A antibody (1:100, Clone 26503, R&D Systems, Minneapolis, USA) was used. The secondary antibodies were Alexa Fluor 488 or 555 conjugated anti-mouse IgG antibodies (1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), respectively. The nuclei were counterstained with TO-PRO-3 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and showed in blue as pseudo-color blue. Pictures were captured using Zeiss LSM 710 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with analysis software. Images and fluorescent intensity were measured with Fiji software [46]. Intensity of two groups was analyzed with the independent samples *t*-test.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS version 20 software. Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), and statistical analysis was performed using the independent samples *t*-test and one-way ANOVA with Bonferroni correction. $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

PPARgamma regulates VEGF-A expression

To clarify the role of PPARgamma in regulation of VEGF-A expression, lungs of PPARgamma knock-out mice were studied. Fluorescent immunohistochemistry of VEGF-A protein revealed a significantly higher expression of the VEGF-A protein in the lungs of PPARgamma KO mice than in their wild-type litter mates (Fig. 1a), indicating that PPARgamma inactivation is required for VEGF-A production. Emphasizing the initial observation, significantly ($p < 0.05$) increased VEGF-A expression was detected in primary clinical samples (Additional file 2: Table S1) of both AC and SCC (Fig. 1b), while PPARgamma levels were reduced ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) in both tumor types compared to normal, non-diseased, primary lung controls. Additionally, comparative analysis of primary AC and SCC samples highlighted existing differences in the two NSCLC subtypes. While lower PPARgamma mRNA

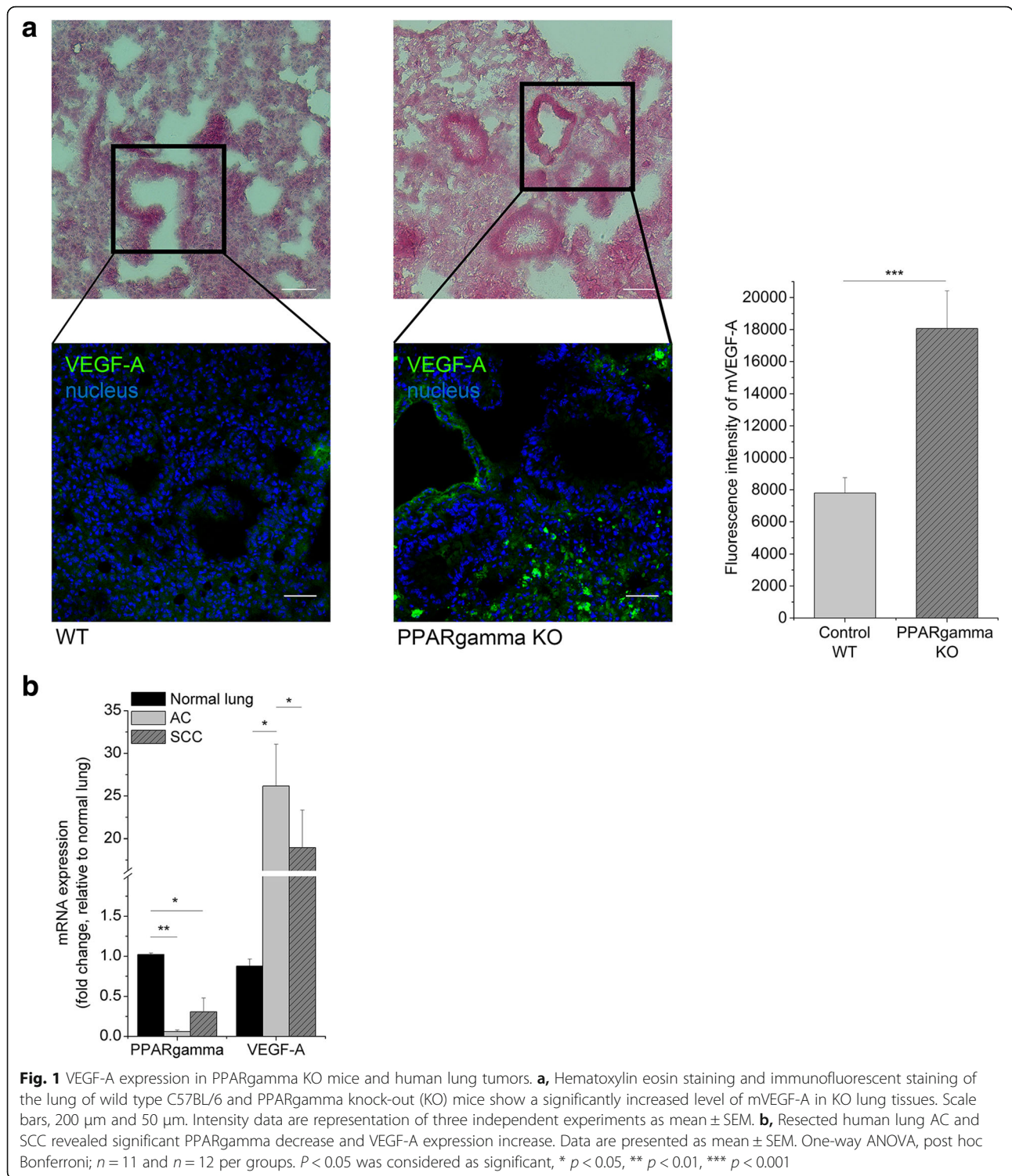
levels characterized significantly higher VEGF-A expression in AC, higher PPARgamma and lower VEGF-A mRNA described SCC (Fig. 1b).

To prove that canonical Wnt signaling induced down-regulation of PPARgamma triggers VEGF-A expression, A549 lung adenocarcinoma cell line was treated with the chemical activator of the canonical Wnt signaling pathway, the beta-catenin activator LiCl [41]. Inhibition of PPAR reporter activity (Fig. 2a) by LiCl (10 mM) lead to increased VEGF-A mRNA (Fig. 2b) and protein expression (Fig. 2c). Inhibition of PPARgamma by LiCl did not affect PPARgamma mRNA expression suggesting that PPARgamma activity is the key factor in VEGF-A regulation.

To support this observation and as the reporter system is not specific to PPARgamma, we used direct PPARgamma agonist and antagonist treatment of human fibroblast cells to determine the role of PPARgamma in VEGF-A regulation. Inhibition of PPARgamma upon GW9662 antagonist treatment increased VEGF-A levels, while the presence of a PPARgamma agonist resulted in decreased VEGF-A mRNA and protein levels (Fig. 2d and e) supporting the theory that VEGF-A upregulation in AC and SCC lung cancers are a direct consequence of PPARgamma reduction.

Wnt5a induces miR-27b a regulator of both PPARgamma expression and blood vessel branching

As only the beta-catenin dependent canonical Wnt signaling has been reported repeatedly to down-regulate PPARs [30, 44] and consequently up-regulate VEGF-A [47], it was not clear how SCC samples with high levels of non-canonical Wnt ligands (Fig. 3a and b) can trigger the same mechanism? In the literature PPARgamma has been described to have a highly conserved binding site in its 3'UTR that is a direct target of miR-27b [48]. Binding of miR-27b to its target sequence can suppress PPARgamma expression [49] and augment VEGF-A induced angiogenesis [50]. Importantly, both miR-27b as well as another miRNA, miR-200b can inhibit blood vessel branching during angiogenesis [51, 52]. Based on the above studies we theorized that differences in formation of blood vessel networks in AC and SCC are due to variations in microRNAs and VEGF-A levels. To investigate, both miR-27b and miR-200b levels were measured in primary human AC and SCC samples. Significantly higher expression levels were determined for both miRNA in primary SCC tissues compared to AC (Fig. 3c) indicating existence of miRNA dependent differential regulation of angiogenesis in the two NSCLC subtypes. To test whether the different molecular microenvironment characterized by increased Wnt5a levels in SCC would explain variations in miRNA expression, 3D lung aggregate cultures were exposed to non-canonical Wnt-



s; rhWnt5a and rhWnt11. Wnt5a and Wnt11 were selected in the experiments as they were both reported to have higher levels in SCC than in AC [37]. Interestingly, while rhWnt11 had no effect on either miRNAs (Fig. 3d), miR-27b expression was significantly increased by rhWnt5a treatment (Fig. 3d), while miR-200b levels were

unaffected. Remarkably, rhWnt5a could not up-regulate miR-27b in the presence of a PPARgamma agonist, only if the antagonist was present (Fig. 3e). The actual VEGF-A expression was, however, lower (Fig. 3e) than induced by the PPARgamma antagonist on its own. Additionally, while rhWnt5a treatment on its own did not increase

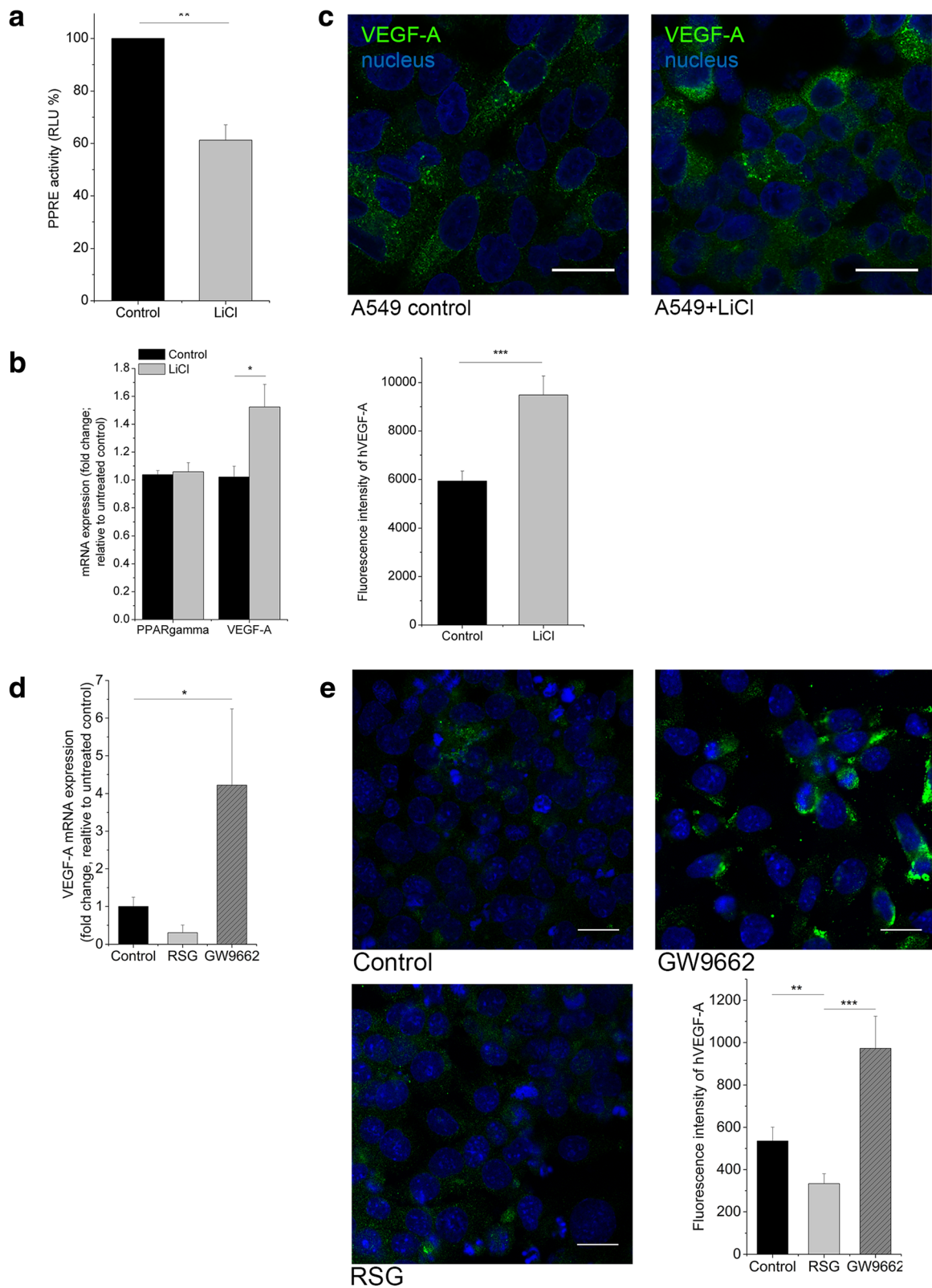


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 2 VEGF-A expression following modification of PPARgamma activity in A549 lung adenocarcinoma cell line transfected with PPRE control or reporter plasmid. **a**, Mimicking beta-catenin dependent canonical Wnt pathway activation using 10 mM LiCl led to significant decrease in PPRE reporter activity. **b**, 10 mM LiCl treatment induced VEGF-A mRNA expression compared to PPRE control cells and also **c**, 10 mM LiCl increased VEGF-A protein levels. Error bars, SEM. One-way ANOVA, post hoc Bonferroni; $n = 4$. Scale bars, 20 μm . **d**, VEGF-A mRNA expression decreased after 10 μM PPARgamma agonist treatment (RSG), while 10 μM PPARgamma specific antagonist (GW9662) increased VEGF-A transcript levels. Independent samples *t*-test, $n = 3$. **e**, VEGF-A protein level shows similar pattern after 10 μM RSG and 10 μM GW9662 treatment. Fluorescence intensity are representations of three different experiments as mean \pm SEM. One-way ANOVA, post hoc Bonferroni; $n = 3$. Scale bars, 20 μm . $P < 0.05$ was considered as significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

VEGF-A levels at the time point analyzed (48 h treatment, data not shown) implicating a parallel mechanism that is required for PPARgamma inhibition even in the presence of the non-canonical Wnt pathway dominated microenvironment.

Wnt5 regulates VEGF-A induced endothelial cell motility

As VEGF-A has previously been determined to stimulate endothelial cell proliferation and migration [53], expression of endoglin (Eng or CD105) a transmembrane auxiliary receptor for transforming growth factor-beta (TGF-beta) that is predominantly expressed on proliferating endothelial cells was also tested [54]. Analysis of primary SCC and AC tissue samples revealed that the endothelial cell proliferation marker Eng (CD105) was significantly lower in SCC compared to AC (Fig. 4a and b). Although VEGF-A was significantly higher than normal in both cancer subtypes, VEGF-A levels in SCC were lower than in AC (Fig. 1b). To be able to study the molecular effects of high VEGF-A levels on endothelial cells, in vitro studies were performed using a three dimensional (3D) human lung aggregate model tissue consisting of primary human small airway epithelial cells (SAEC), microvascular lung endothelial cells (HMVEC-L), and human fibroblasts (NHLF and F11) (Additional file 2: Figure S1). The 3D aggregate culture conditions provided close to natural, yet defined, cellular environment for molecular studies. qRT-PCR analysis of the lung model tissue aggregates revealed highly similar expression levels of angiogenic stimulators including VEGF-A, IL-1beta and HIF-1alpha to primary human lungs (Additional file 3: Figure S2) indicating that the model is suitable to study pro- and/or anti-angiogenic mechanisms. To recreate the VEGF-A high tumor-like microenvironment VEGF-A¹⁶⁵ was cloned into human fibroblast cells (Additional file 4: Figure S3). The effects of VEGF-A were investigated by comparing aggregates with VEGF-A^{normal} and VEGF-A over-expressing (VEGF-A^{high}) fibroblasts (Additional file 5: Figure S4). Flow cytometric analysis revealed that high levels of VEGF-A lead to elevated Eng (CD105) expression on CD31⁺ endothelial cells (Fig. 4c, Additional file 6: Figure S5). To

test whether Wnt5a can modulate VEGF-A^{high} microenvironment, 3D lung tissue aggregates containing VEGF-A^{normal} and VEGF-A^{high} fibroblasts were exposed to rhWnt5a. Flow cytometric analysis revealed that rhWnt5a did not block proliferation marker Eng (CD105) expression (Fig. 4c, Additional file 6: Figure S5) indicating that Eng (CD105) is not under Wnt5a control.

This result was surprising. Because the endothelial cell proliferation marker Eng (CD105) expression was lower in SCC compared to AC, and VEGF-A levels were similarly elevated in both cancer types, endothelial cell proliferation would be expected. To investigate, lung tissues of control and PPARgamma KO mice were stained for CD105. Significantly lower levels of CD105 was detected in PPARgamma KO animals than in their wild type controls (Additional file 7: Figure S6) indicating that PPARgamma associated events are responsible for the reduction but not Wnt5a. As Wnt5a levels are not affected in lungs of the PPARgamma KO animals (Additional file 8: Figure S7), our findings further suggest that CD105 expression is not under Wnt5a control. To clarify the role of Wnt5a, cellular motility was investigated in the model cultures. All these findings led us to the hypothesis that endothelial activity cannot be the only answer to the different therapeutic response. As SCC possesses more vulnerable capillaries [16] and lower microvessel density [15], it might be an indication of an altered endothelial behavior, especially in migration and motility.

In the VEGF-A^{high} microenvironment endothelial cells migrated towards the source of VEGF-A, the VEGF-A^{high} fibroblasts (Fig. 4d and Additional file 5: Figure S4). As fibroblasts naturally provide the core of the 3D lung tissue aggregate co-cultures, endothelial cells concentrated in the center of the tissue aggregate. In the aggregate tissues with normal VEGF-A levels the endothelial cells remained evenly distributed (Fig. 4d). To investigate whether Wnt5a affects endothelial cell motility, aggregate cultures were treated with rhWnt5a. This inhibited endothelial cell migration towards VEGF-A^{high} fibroblasts, and endothelial cells remained scattered amongst other cell types in the aggregate lung

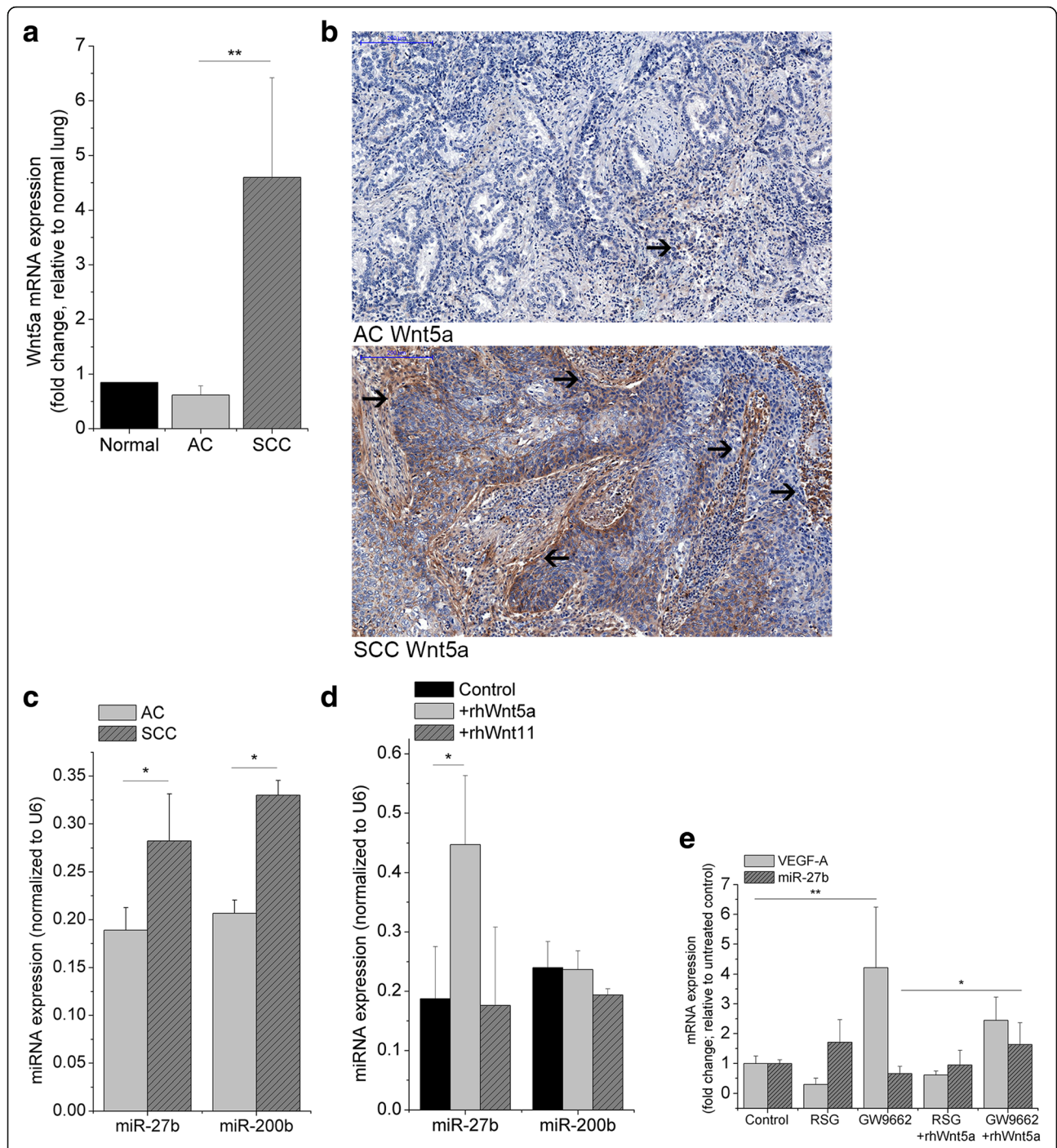


Fig. 3 Transcript analysis of Wnt5a, miRNA and VEGF-A in primary human lung cancer samples of AC and SCC and 3D in vitro lung aggregate cultures. **a**, Wnt5a mRNA is significantly upregulated in SCC compared to both normal lung and AC specimens. Error bars, SEM. One-way ANOVA, post hoc Bonferroni; $n = 11$ and $n = 12$ per groups. **b**, Immunohistochemical staining of Wnt5a in primary resected AC and SCC samples, $n = 3$ per groups. **c**, miR-27b and miR-200b expression levels are significantly lower in AC compared to SCC. Error bars; SEM. Independent samples t -test, $n = 5$ per groups. **d**, miR-27b is up-regulated by rhWnt5a in 3D lung aggregate cultures, while neither miR-27b nor miR-200b was affected by rhWnt11. Error bars; SEM. One-way ANOVA, post hoc Bonferroni, $n = 6$. **e**, VEGF-A and miR-27b expression levels after 10 μ M RSG (PPARgamma agonist) and 10 μ M GW9662 (PPARgamma antagonist) and combination treatment with rhWnt5a. Error bars; SEM. Independent samples t -test $n = 3$. $P < 0.05$ was considered as significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

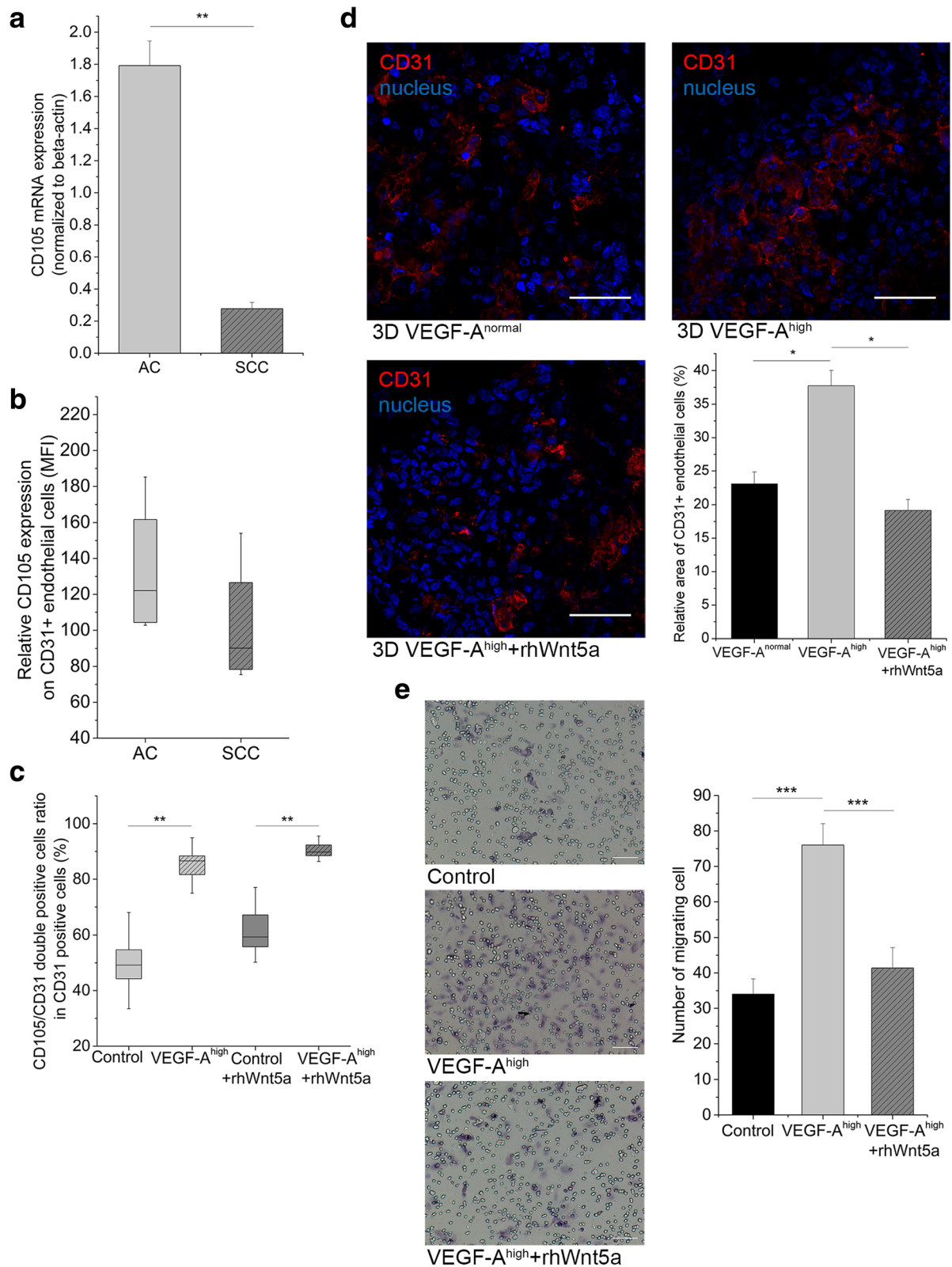


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 The effect of Wnt5a on VEGF-A induced endothelial cell activation and motility. **a**, CD105 mRNA expression is significantly higher in primary AC compared to SCC samples. Error bars, SEM. One-way ANOVA, post hoc Bonferroni; $n = 11$ and $n = 12$ per groups. **b**, Flow cytometric analysis of CD105 protein expression in CD31 positive endothelial cells in primary AC and SCC samples. $n = 6$ per groups. **c**, Flow cytometric analysis of CD105 levels in normal and high VEGF-A microenvironment in 3D lung aggregate tissues has also shown an increase of activation marker CD105 in VEGF-A^{high} tissues. The double positive (CD105/CD31) cell population was considered as activated endothelial cells. Independent samples *t*-test, $n = 6$. 1 $\mu\text{g/ml}$ rhWnt5a treatment had no effect on the VEGF-A induced endothelial cell activation measured by the double positive (CD105/CD31) cell population identified by flow cytometric analysis. Independent samples *t*-test, $n = 6$. **d**, Localization of endothelial cells was identified by immunofluorescent staining of CD31 and analyzed by confocal microscopy in 3D lung tissue aggregates. In VEGF-A^{normal} microenvironment endothelial cells remained diffuse in the tissue. Under VEGF-A excess endothelial cell migrated towards the source (VEGF-A^{high} fibroblasts) of the signal in the center of the aggregate tissue. 1 $\mu\text{g/ml}$ rhWnt5a treatment of VEGF-A^{high} tissue aggregates inhibited endothelial cell accumulation in the center of the aggregate. Bar chart represents the quantification of endothelial cell distribution. Relative area of CD31+ endothelial cells are compared to total field. Percentages were calculated as relative area of endothelial cells/area of total field *100. Error bars; SEM. Independent samples *t*-test $n = 3$. Representative images of three independent experiments are shown. Scale bars, 50 μm . **e**, HMVEC-L transwell migration assay. Endothelial cells migrate significantly faster towards VEGF-A^{high} fibroblast, while 1 $\mu\text{g/ml}$ rhWnt5a can reverse the effect of elevated VEGF-A level. Scale bar 100 μm . One-way ANOVA, $n = 3$. $P < 0.05$ was considered as significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

tissue. The inhibitory effect of Wnt5a on endothelial cell motility was tested using migration assays in transwell chambers. HMVEC-L cells migrated significantly faster towards VEGF-A^{high} fibroblasts, while addition of recombinant human Wnt5a significantly inhibited VEGF-A induced endothelial cell migration (Fig. 4e).

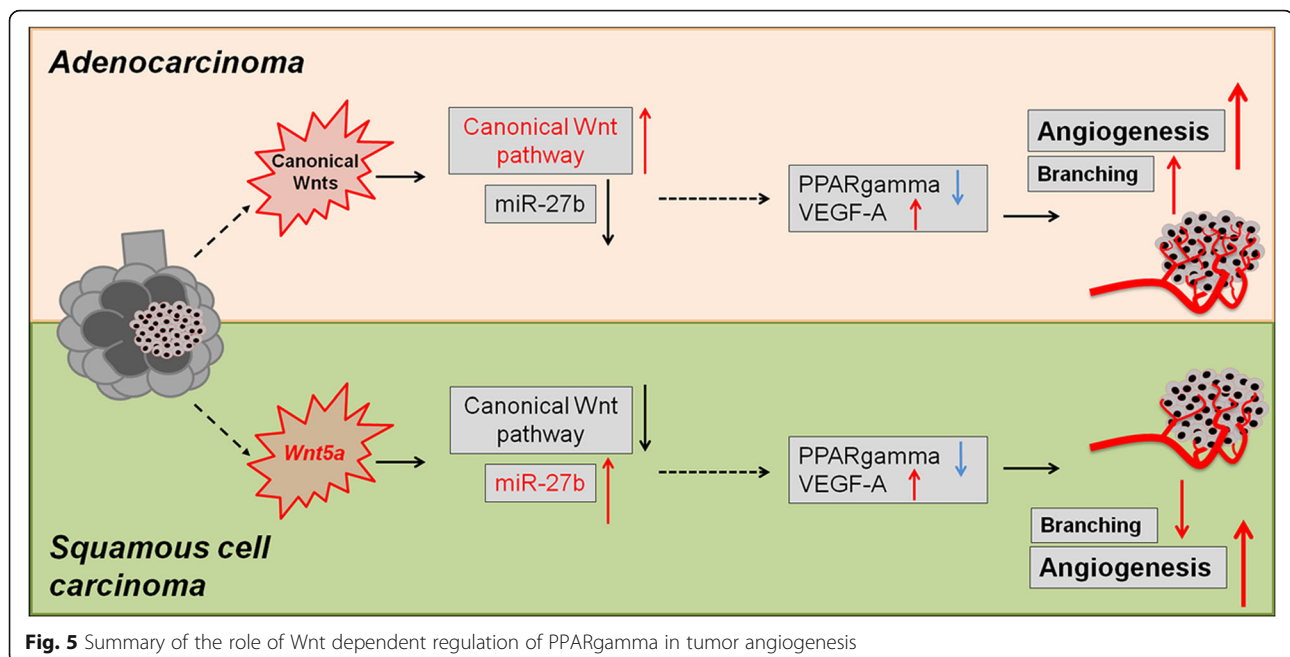
Discussion

While cancer progression is frequently attributed to increased angiogenesis, molecular regulation that can lead to significant differences in anti-angiogenic therapy responses have not been reported. As AC and SCC have characteristic molecular differences in their Wnt microenvironment [37] and differential treatment responses to anti-angiogenic therapy [13] including increased necrosis and pulmonary hemorrhage in SCC, comparative studies of the two NSCLC subtypes provided a promising platform for molecular studies of blood vessel formation. Recent evidence suggested that adverse reactions in SCC patients might be due to malfunction of endothelial repair processes [55], tumor type specific erosion of blood vessels [56] or involvement of major vascular structures in SCC [57]. Our studies provided an additional dimension to the potential mechanism by making extensive use of primary human lung tissues both of normal lung and resected lung AC and SCC tumors, knock-out mice as well as an in vitro 3D human lung tissues model assembled to assess the role of Wnt5a in angiogenesis. Based on our study, we postulate that decreased expression of PPARgamma is primarily responsible for induction of increased VEGF-A levels detected both in AC and SCC. However, the molecular mechanism that leads to PPARgamma down-regulation is different in AC and SCC, and it is this molecular mechanism rather than tumor localization that leads to more serious adverse reactions in SCC patients.

This conclusion is based on several pieces of evidence presented here. Down-regulation of PPARgamma was

demonstrated to be essential for up-regulation of the angiogenesis stimulator factor VEGF-A using PPARgamma KO animals, cell lines and a fully human in vitro lung tissue aggregate system where the PPRE reporter system, application of PPARgamma agonist and antagonist supported direct regulatory interactions between the two molecules. Consequently, the significantly reduced PPARgamma and increased VEGF-A levels in both primary AC and SCC explained increased vascularization in both tumors. Differential therapeutic response, however, could not be explained by the very similar molecular microenvironments of the two tumor subtypes.

For better understanding of the process of PPARgamma down-regulation we considered that down-regulation of PPARgamma transcription is a beta-catenin-dependent and therefore canonical Wnt pathway dependent process [44]. As lung ACs are characterized by increased canonical and therefore beta-catenin dependent Wnt signal activity [58] such molecular basis can explain PPARgamma reduction in AC [44]. The similarly high VEGF-A and reduced PPARgamma levels in SCC samples seem counter-intuitive as in SCC the non-canonical, beta-catenin independent Wnts play the dominant role [59]. Our initial data, however, provide some explanations. Wnt5a is the characteristically highly expressed Wnt in cancers with squamous histology and increased Wnt5a levels are also a trademark of lung SCC. Interestingly, Wnt5a can up-regulate miR-27b which miRNA has been reported to bind to the highly conserved binding site in the 3'UTR of PPARgamma [48] and suppress its expression [49]. Consequently, up-regulation of VEGF-A [50] can use this particular route (Fig. 5). Wnt5a did not induce VEGF-A directly at the time-points measured in this study, indicating that other mechanisms are also needed to achieve inhibition of PPARgamma. Inhibition of PPARgamma in the presence of Wnt5a, however, modified VEGF-A



levels supporting our theory that Wnt5a plays a modulatory role in the angiogenic process. Certainly, there are limitations to the study as not all VEGF-A isoforms [60] nor pericytes were investigated in the above experiments therefore the full effect of Wnt5a on the angiogenic process could not be assessed. However, since Cox-2 (an enzyme responsible for pericyte recruitment) is inhibited by PPARgamma [61, 62], we can hypothesize that lower PPARgamma levels and/or activity could reduce pericyte coverage. As SCC has higher PPARgamma levels than AC, perhaps high Wnt5a can not only reduce endothelial cell but also pericyte mobility resulting in immature vessel formation that makes SCC more prone to hemorrhage. Further studies are needed to investigate the above hypothesis.

Despite the limitations, further scrutiny of the data highlighted additional differences between AC and SCC at the level of blood vessel branching. Inhibitors of branching and tube formation like miR-200b [63] and miR-27b [51] are both increased in SCC compared to AC potentiating differences in the actual blood vessel formation and pattern in tumors of squamous histology. Such differences could lead to alterations in therapeutic response. As only miR-27b is regulated by Wnt5a, further studies are needed to find the molecules that control miR-200b. Additionally, miR-27b can also block the Wnt5a target NF-kappaB [64] and the TGF-beta target, Gremlin-1 [65]. As VEGF-A is also upregulated following by NF-kappaB activation [66] and Gremlin-1 acts as a pro-angiogenic factor via binding to VEGFR2 [67] the lower VEGF-A levels in SCC might explain such

differences and demonstrate a very complex regulatory process of angiogenesis that requires follow-up investigations to provide explanations to more severe adverse therapeutic reactions in SCC.

Conclusion

Finally, it may be possible in the future to use serum levels of Wnt5a, miR-27b, PPARgamma levels and/or activity of the tumor tissue as prognostic markers to identify groups of patients that are at higher risk of developing hemorrhage if treated with anti-angiogenic therapies.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Characteristics of patients. The table contains number, histological types, sex, age and pathological TNM status of all patients. (DOCX 14 kb)

Additional file 2: Figure S1. 3D human lung tissue aggregates to study angiogenesis. To investigate the molecular background of angiogenesis, a three dimensional human lung tissue model was set up using three characteristic cell types of the lung. Namely, primary normal small airway epithelial cells (SAEC), normal human lung fibroblast (NHLF) or VEGF-A-GFP overexpressing human fibroblast (F11) and human microvascular endothelial cells lung subtype (HMVEC-L). GFP aided the visualization of VEGF-A overexpressing fibroblasts in the core of the lung model. Actin was labeled by Alexa Fluor 568 conjugated phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) to detect all cells in the tissue. Scale bar, 200 μ m. (TIF 1897 kb)

Additional file 3: Figure S2. Analysis of expression of angiogenic genes in 3D lung aggregates and normal human lung. Comparing the in vitro model to normal human lung tissue revealed that co-culture expresses VEGF-A, IL-1beta and HIF-1alpha angiogenic factors at the same level. qRT-PCR data are normalized to beta-actin housekeeping gene. Error bars, SEM. Independent samples *t*-test, $n = 3$. $P < 0.05$ was considered as significant, ns: not significant. (TIF 90 kb)

Additional file 4: Figure S3. Overexpression of VEGF-A in F11 cell line. Human VEGF-A-IRES-GFP was cloned into human F11 cell line. Overexpression of hVEGF-A protein was analyzed by fluorescent staining using anti-human VEGF-A as primary antibody. The secondary antibody was Northern Light anti-mouse NL-557. As VEGF-A is a secreted, soluble factor, cells were treated with brefeldin-A at 10 µg/ml for 4 h to inhibit protein transport. Accumulation of the protein was detected after brefeldin-A treatment. Images were captured using Olympus IXB1 fluorescence microscopy equipped with CCD camera. Scale bars, 50 µm. (TIF 3030 kb)

Additional file 5 Figure S4. Area of sprout outgrowth from 3D lung aggregates in normal and high VEGF-A microenvironment. Endothelial cells are evenly distributed in VEGF-A^{normal} microenvironment, while in VEGF-A^{high} microenvironment the endothelial cells remained close to the VEGF-A source. Data are representation of three independent experiments. Independent samples *t*-test. Scale bars, 200 µm. (TIF 1597 kb)

Additional file 6: Figure S5. Flow cytometric analysis of VEGF-A overexpressing 3D lung aggregates in the absence or presence of rhWnt5a. Representative dot plots of flow cytometric analysis of five independent experiments. 3D tissue cultures were created using normal VEGF-A and VEGF-A^{high} fibroblasts, respectively. Then the cultures were incubated in the presence or absence of rhWnt5a, dissociated and stained with anti-CD105 and anti-CD31 antibodies and analyzed in a flow cytometer. (TIF 469 kb)

Additional file 7: Figure S6. Endoglin (CD105) expression of CD31+ endothelial cells in the lung of WT and PPARgamma KO mice. Immunofluorescence staining of wild type and PPARgamma KO mice showed decreased level of CD105 protein expression in PPARgamma KO lung tissues. Intensity data are representation of three individual experiments. Scale bars 50 µm. Staining intensity was quantified and presented in a bar chart. Error bars, SEM. Independent samples *t*-test, *n* = 3. *P* < 0.05 was considered as significant, *P* < 0.001. (TIF 3853 kb)

Additional file 8: Figure S7. Wnt5a expression in the lung of WT and PPARgamma KO mice. No differences were detected in Wnt5a protein expression in wild type and PPARgamma KO mice. (Scale bars 50 µm). The stainings of lung tissue sections are representatives of three individual experiments. Fluorescence intensity was quantified and presented in a bar chart. Error bars, SEM. Independent samples *t*-test, *n* = 3. *P* < 0.05 was considered as significant, ns: not significant. (TIF 769 kb)

Acknowledgments

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. The authors are grateful to Attila Pap for breeding the PPARgamma null mouse strain in the Laboratory Animal Core Facility of the University of Debrecen. The authors would like to thank Prof M Nyitrai Department of Biophysics, University of Pécs for consultations during confocal microscopic analysis. The authors are also indebted to Prof Mary Keen, Department of Pharmacy and Therapeutics, School of Clinical and Experimental Medicine, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham for discussions and language editing.

Funding

JEP was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

JR: performed the experiments, EK, DF: isolated RNA from lung tissues, MM: performed flow cytometry, SZME: confocal microscopic analysis, KK: prepared recombinant constructs. TFM, VS, TL, GS: provided the lung tissue and performed staining and analysis of primary human lung tissues, JEP designed the studies, JR and JEP have written the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

JR, EK, MM, DF, salary from Humeltis Ltd; JEP, shareholder in Humeltis Ltd.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Lung tissue samples were collected during lung resections at the Department of Surgery, University of Pécs, Hungary. The project was approved by the Ethical Committee of the University of Pécs (ETT-TUKEB 366/2015). Patients had given written consent to provide samples for research purposes. Ethics approval obtained for the patient samples covered the use of the cells obtained from patients.

Animals were kept at the Laboratory Animal Core Facility of the University of Debrecen that is registered to breed genetically-modified mouse strains (reg. no.: TMF/82-10/2015). Formal ethics approval was not required for our study, as no direct experimentation was performed on the mouse strain otherwise euthanized in the Animal Core Facility.

Author details

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, University of Pécs, 2 Rokos Str, Pécs 7624, Hungary. ²Medical Microbiology and Immunity, University of Pécs, 12 Szigeti Str, Pécs 7624, Hungary. ³Biophysics, University of Pécs, 12 Szigeti Str, Pécs 7624, Hungary. ⁴Pathology, University of Pécs, 12 Szigeti Str, Pécs 7624, Hungary. ⁵Internal Medicine, Pulmonology, University of Pécs, 2 Rakoczi Str, Pécs 7623, Hungary. ⁶Operational Medicine, University of Pécs, 12 Szigeti Str, Pécs 7624, Hungary. ⁷János Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 20 Ifjúság Str, Pécs 7622, Hungary. ⁸Department of Surgery, Thoracic Surgery Unit, Petz A Hospital, 2-4 Vasvári Str, Győr 9023, Hungary. ⁹Humeltis Ltd, János Szentágotthai Research Center, University of Pécs, 20 Ifjúság Str, Pécs 7622, Hungary.

Received: 12 April 2016 Accepted: 9 November 2016

Published online: 23 November 2016

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2009;59:225–49. [cited 2015 Jul 16] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474385>.
- Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, et al. Non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. [Internet] 2012;10:1236–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23054877>.
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2008;83:584–94. [cited 2014 Nov 16] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2718421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- D'Addario G, Früh M, Reck M, Baumann P, Klepetko W, Felip E. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2010;21 Suppl 5:v116–9. [cited 2015 Sep 12] Available from: http://annonc.oxfordjournals.org/content/21/suppl_5/v116.full.
- Stahel R, Peters S, Baas P, Brambilla E, Cappuzzo F, De Ruyscher D, et al. Strategies for improving outcomes in NSCLC: a look to the future. *Lung Cancer* [Internet]. 2013;82:375–82. [cited 2015 Oct 16] Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500213003905>.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* [Internet]. 2013;339:1546–58. [cited 2014 Jul 9] Available from: <http://www.sciencemag.org/content/339/6127/1546.abstract>.
- Boolell V, Alamgeer M, Watkins D, Ganju V. The evolution of therapies in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2015;7:1815–46. [cited 2015 Oct 16] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4586797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Korpanty G, Smyth E, Sullivan LA, Brekken RA, Carney DN. Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2010;235:3–9. SAGE Publications. [cited 2015 Nov 13] Available from: <http://ebm.sagepub.com/content/235/1/3.full>.
- Moens S, Goveia J, Stapor PC, Cantelmo AR, Carmeliet P. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2014;25:473–82. [cited 2015 Sep 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169850>.

10. Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E, Montemurro S, Valerio P, Ribatti D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Curr Med Chem* [Internet]. 2006;13:1845–57. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842197>.
11. Zhan P, Wang J, Lv X, Wang Q, Qiu L, Lin X, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009;4:1094–103. [cited 2015 Oct 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687765>.
12. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2006;355:2542–50. [cited 2015 Sep 30] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167137>.
13. Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R. Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer. *Drugs* [Internet]. 2014;74:403–13. [cited 2015 Sep 8] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4014113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
14. Oliver TG, Patel J, Akerley W. Squamous non-small cell lung cancer as a distinct clinical entity. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 2015;38:220–6. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806712>.
15. Kojima H, Shijubo N, Abe S. Thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in patients with Stage I lung adenocarcinoma. *Cancer* [Internet]. 2002;94:1083–93. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920479>.
16. Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, et al. Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2013;44:1586–96. [cited 2015 Oct 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23522064>.
17. Pan H, Clarke B, Wickline SA. Macrophage pro-angiogenic miRNA, miR-27b, is under NF-kB transcription regulation. *FASEB J*. 2012;26:1120.9–1120.9. Federation of American Societies for Experimental Biology.
18. Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4:2427. [cited 2016 Sep 6] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018975>.
19. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* [Internet]. 2014;17:471–94. [cited 2015 Sep 8] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4061466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
20. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274:9116–21. [cited 2015 Jul 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085162>.
21. Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Romero M, Quintela AM, López-Sepúlveda R, et al. Endothelium-dependent vasodilator effects of peroxisome proliferator-activated receptor beta agonists via the phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2010;332:554–61. [cited 2015 Jul 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906781>.
22. Peeters LLH, Vigne J-L, Tee MK, Zhao D, Waite LL, Taylor RN. PPAR γ represses VEGF expression in human endometrial cells: Implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis* [Internet]. 2006;8:373–9. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400517>.
23. Gacche RN. Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness. *Oncogenesis* [Internet]. 2015;4:e153. Macmillan Publishers Limited. [cited 2015 Nov 13] Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2015.14>.
24. Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis* [Internet]. 2003;6:165–9. [cited 2015 Oct 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041792>.
25. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carrón R, Sanz-Rodríguez F, Pérez-Barriocanal F, et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* [Internet]. 2004;18:609–11. [cited 2015 Jul 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734648>.
26. Lebrin F, Goumans M-J, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* [Internet]. 2004;23:4018–28. [cited 2015 Jul 20] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
27. Salomone S, Drago F. Effects of PPAR γ ligands on vascular tone. *Curr Mol Pharmacol* [Internet]. 2012;5:282–91. [cited 2015 Oct 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122458>.
28. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* [Internet]. 2005;96:684–92. [cited 2015 Oct 20] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718503>.
29. Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* [Internet]. 2003;199:8–17. [cited 2015 Oct 29] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12474221>.
30. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2009;5:442–7. [cited 2015 Sep 9] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581903>.
31. Lecarpentier Y, Claes V, Duthoit G, Hébert J-L. Circadian rhythms, Wnt/beta-catenin pathway and PPAR alpha/gamma profiles in diseases with primary or secondary cardiac dysfunction. *Front Physiol* [Internet]. 2014;5:429. [cited 2016 Feb 25] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4220097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
32. Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res* [Internet]. 2010;107:943–52. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947863>.
33. He B, Barg RN, You L, Xu Z, Reguart N, Mikami I, et al. Wnt signaling in stem cells and non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2005;7:54–60. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098245>.
34. Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir Res* [Internet]. 2006;7:15. [cited 2015 Sep 9] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1397816&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
35. Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* [Internet]. 2010;106:1798–806. [cited 2015 Jun 1] Available from: <http://circres.ahajournals.org/content/106/12/1798.full>.
36. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2014;106:djt356. [cited 2015 Jun 17] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309006>.
37. Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, Kovacs T, et al. Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. *PLoS One* [Internet]. 2013;8:e57393. [cited 2015 Jul 20] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
38. Cheng C, Yeh J, Fan T-P, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2008;365:285–90. [cited 2015 Oct 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986384>.
39. Nadra K, Quignodon L, Sardella C, Joye E, Mucciolo A, Christ R, et al. PPAR γ in placental angiogenesis. *Endocrinology* [Internet]. 2010;151:4969–81. [cited 2016 Mar 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810566>.
40. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;111:1021–46. [cited 2016 Sep 6] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117809>.
41. Haq S, Michael A, Andreucci M, Bhattacharya K, Dotto P, Walters B, et al. Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100:4610–5. National Academy of Sciences; [cited 2016 Sep 7] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668767>.
42. Whiteside C, Wang H, Xia L, Munk S, Goldberg HJ, Fantus IG, et al. Rosiglitazone prevents high glucose-induced vascular endothelial growth factor and collagen IV expression in cultured mesangial cells. *Exp Diabetes Res* [Internet]. 2009;2009:1–11. Hindawi Publishing Corporation. [cited 2016 Aug 8] Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2009/910783/>.
43. Seargent JM, Yates EA, Gill JH. GW9662, a potent antagonist of PPAR γ , inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone, independently of PPAR γ activation. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2004;143:933–7. Wiley-Blackwell. [cited 2016 Aug 8] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533890>.

44. Kovacs T, Csongei V, Feller D, Ernszt D, Smuk G, Sarosi V, et al. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell* [Internet]. 2014;13:838–49. [cited 2015 Jul 20] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4331750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
45. Bovia F. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* [Internet]. 2002;101:1727–33. [cited 2015 Sep 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406892>.
46. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2012;9:676–82. [cited 2016 Aug 8] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320065>.
47. Chintalgattu V, Harris GS, Akula SM, Katwa LC. PPAR-gamma agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2007;74:140–50. [cited 2016 Aug 8] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320065>.
48. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;390:247–51. [cited 2015 Oct 30] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800867>.
49. Jennewein C, von Knethen A, Schmid T, Brüne B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285:11846–53. [cited 2015 Sep 8] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
50. Veliceasa D, Biyashev D, Qin G, Misener S, Mackie AR, Kishore R, et al. Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b. *Vasc Cell* [Internet]. 2015;7:6. [cited 2015 Nov 13] Available from: <http://www.vascularcell.com/content/7/1/6>.
51. Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL, Janknecht R, Dooley WC, Ding W-Q. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol Cancer* [Internet]. 2015;14:133. [cited 2015 Jul 18] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4504101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
52. Choi Y-C, Yoon S, Jeong Y, Yoon J, Baek K. Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b. *Mol Cells* [Internet]. 2011;32:77–82. Korean Society for Molecular and Cellular Biology. [cited 2016 Sep 6] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10059-011-1042-2>.
53. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2004;56:549–80. [cited 2015 Jan 26] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15602010>.
54. Liu Z, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, van Dinther M, et al. ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PLoS One* [Internet]. 2014;9:e86273. Public Library of Science. [cited 2015 Oct 23] Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086273>.
55. Schmidinger M, Bellmunt J. Plethora of agents, plethora of targets, plethora of side effects in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2010;36:416–24. [cited 2015 Sep 9] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163917>.
56. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2007;96:1788–95. [cited 2015 Aug 31] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2359962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
57. Reck M, Barlesi F, Crinò L, Henschke CI, Isla D, Stiebel S, et al. Predicting and managing the risk of pulmonary haemorrhage in patients with NSCLC treated with bevacizumab: a consensus report from a panel of experts. *Ann Oncol* [Internet]. 2012;23:1111–20. [cited 2015 Sep 8] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
58. Li X-Q, Yang X-L, Zhang G, Wu S-P, Deng X-B, Xiao S-J, et al. Nuclear β -catenin accumulation is associated with increased expression of Nanog protein and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2013;11:114. [cited 2015 Nov 13] Available from: <http://www.translational-medicine.com/content/11/1/114>.
59. Yao L, Sun B, Zhao X, Zhao X, Gu Q, Dong X, et al. Overexpression of Wnt5a promotes angiogenesis in NSCLC. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:832562. Available from: [cited 2015 Oct 27] <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4066942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
60. Biselli-Chicote PM, Oliveira ARCP, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2012;138:363–70. Springer-Verlag. [cited 2016 Sep 6] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00432-011-1073-2>.
61. Lee A, Frischer J, Serur A, Huang J, Bae J-O, Kornfield ZN, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 disrupts tumor vascular mural cell recruitment and survival signaling. *Cancer Res* [Internet]. 2006;66:4378–84. [cited 2016 Sep 7] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618763>.
62. Bishop-Bailey D, Swales KE, Bishop-Bailey D, Swales KE. The Role of PPARs in the Endothelium: Implications for Cancer Therapy. *PPAR Res* [Internet]. 2008;2008:1–12. [cited 2016 Sep 7] Hindawi Publishing Corporation Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ppar/2008/904251/>.
63. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes* [Internet]. 2011;60:1314–23. [cited 2015 Sep 8] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
64. Thulasigam S, Massilamany C, Gangaplara A, Dai H, Yarbava S, Subramaniam S, et al. miR-27b*, an oxidative stress-responsive microRNA modulates nuclear factor-kB pathway in RAW 264.7 cells. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2011;352:181–8. [cited 2015 Sep 8] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350856>.
65. Graham JR, Williams CMM, Yang Z. MicroRNA-27b targets gremlin 1 to modulate fibrotic responses in pulmonary cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2014;115:1539–48. [cited 2015 Sep 10] Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24809>.
66. Tabruyn SP, Griffioen AW. A new role for NF-kB in angiogenesis inhibition. *Cell Death Differ* [Internet]. 2007;14:1393–7. [cited 2015 Nov 13] Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402156>.
67. Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood* [Internet]. 2010;116:3677–80.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma

Domokos Bartis^{1,2,3}, Veronika Csongei^{1,6,9}, Alexander Weich¹, Edit Kiss^{1,6}, Szilvia Barko³, Tamas Kovacs^{1,6}, Monika Avdicevic¹, Vijay K. D'Souza², Judit Rapp^{1,6}, Krisztian Kvell^{1,6}, Laszlo Jakab⁴, Miklos Nyitrai^{2,6}, Tamas F. Molnar⁴, David R. Thickett², Terezia Laszlo⁵, Judit E. Pongracz^{1,6*}

1 Department of Medical Biotechnology, Institute of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **2** Department of Medicine, Medical School, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom, **3** Department of Biophysics, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **4** Department of Surgery, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **5** Department of Pathology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **6** Szentagotai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

Abstract

The majority of lung cancers (LC) belong to the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) type. The two main NSCLC sub-types, namely adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC), respond differently to therapy. Whereas the link between cigarette smoke and lung cancer risk is well established, the relevance of non-canonical Wnt pathway up-regulation detected in SCC remains poorly understood. The present study was undertaken to investigate further the molecular events in canonical and non-canonical Wnt signalling during SCC development. A total of 20 SCC and AC samples with matched non-cancerous controls were obtained after surgery. TaqMan array analysis confirmed up-regulation of non-canonical Wnt5a and Wnt11 and identified down-regulation of canonical Wnt signalling in SCC samples. The molecular changes were tested in primary small airway epithelial cells (SAEC) and various lung cancer cell lines (e.g. A549, H157, etc). Our studies identified Wnt11 and Wnt5a as regulators of cadherin expression and potentiated relocation of β -catenin to the nucleus as an important step in decreased cellular adhesion. The presented data identifies additional details in the regulation of SCC that can aid identification of therapeutic drug targets in the future.

Citation: Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, et al. (2013) Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma. PLoS ONE 8(3): e57393. doi:10.1371/journal.pone.0057393

Editor: Srikumar P. Chellappan, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, United States of America

Received: August 8, 2012; **Accepted:** January 23, 2013; **Published:** March 7, 2013

Copyright: © 2013 Bartis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the TAMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002; (Tarsadalmi Megújulás Operatív Program); TIOP 1.3.1-07/1-2F-2008-0002 (Tarsadalmi Infrastruktúra Operatív Program); K-OTKA_67807_A_07 -2-2012-0093328 (MAG Zrt-NKTH(NFU)-OTKA(Magyar Gazdaságfejlesztési Központ Zrt-Nemzeti Kutatástámogatási Hivatal (Nemzeti Fejlesztési Ugyonokseg)-Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok Iroda or Hungarian Scientific Research Fund) all to JEP and by the K-OTKA grant 34039/KA-OTKA/11-02 to DB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: judit.e.pongracz@aok.pte.hu

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Lung cancer (LC) is the leading cause of cancer death worldwide [1]. About 80% of LCs belongs to the NSCLC type which is erroneously considered as a single entity. The two main NSCLC sub-types, namely AC that arises mostly in the peripheral airways or the bronchio-alveolar region of the parenchyma, and SCC that develops mainly in the proximal airways and affects mostly cigarette smokers, differs not only in aggressiveness but responsiveness to chemotherapy, also. To make the overall picture more complicated, there are an emerging number of combined NSCLCs where malignant tumours are representing themselves as adeno-squamous or mixed type LC. Not surprisingly, the molecular background of AC and SCC development has been a focus of intense investigation. In various studies Wnt signalling has emerged as one of the potential regulators of the carcinogenic process.

Wnt Signalling

Wnt signalling regulates a variety of developmental processes including cell fate specification, proliferation, polarity and migration (reviewed in [2]). Wnt molecules trigger gene transcription via at least three signalling pathways: the canonical or β -catenin dependent, and two non-canonical pathways. When Wnts bind to their trans-membrane receptors, Frizzleds (Fzd) and co-receptors, LRP5/6, signal transduction begins on the canonical pathway. Once stabilized, non-degraded β -catenin molecules move to the nucleus where they activate TCF-LEF-dependent gene transcription. In the absence of Wnt signals, the cytoplasmic β -catenin is subjected to phosphorylation in the APC-Axin-GSK3 β -complex [2] then to subsequent proteasomal degradation. Upon non-canonical Wnt signals, the JNK/API dependent, planar cell polarity (PCP) and the PKC/CAMKII/NFAT dependent Ca²⁺ pathways are activated.

Table 1. List of gene specific primers.

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Product
β-actin(1)	NM_001101	5'-CTGTGCTATCCCTGTACGCCTCTG-3'	5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3'	541 bp
β-actin(2)	NM_001101	5'-GCGCGGTACTACAGCTTCA-3'	5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	55 bp
E-cad	NM_004360	5'-GACCGGTGCAATCTTCAA-3'	5'-TTGACGCCGAGAGTACAC-3'	93 bp
N-cad	NM_002961	5'-AGCTTCTCACGGCATAACC-3'	5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'	133 bp
S100A4	NM_002961	5'-TGGAGAAGGCCCTG-3'	5'-CCCTCTTGCCCGAGTACTTG-3'	58 bp
aSMA	NM_001613.2	5'-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3'	5'-ACAGAGTATTTGCGTCCGAA-3'	88 bp
VIM	NM_003380	5'-ATTCCACTTTGCGTTCAAGG-3'	5'-CTTCAGAGAGGAAGCCGA-3'	97 bp
Wnt5a	NM_003392	5'-TGGCTTTGGCCATATTTTC-3'	5'-CCGATGACTGCATGTGGTC-3'	199 bp
Wnt11	NM_004626	5'-CGTTGGATGTCTTGTGAC-3'	5'-TGACCTCAAGACCCGATACC-3'	209 bp

doi:10.1371/journal.pone.0057393.t001

Wnt Signalling in LC

Analysis of gene expression data has revealed that Wnt pathway activity can be strongly down-regulated in small cell lung cancer (SCLC) through over-expression of inhibitory genes. Proof of deregulation of specific Wnt molecules leading to oncogenic signalling has also emerged. Frequent loss of Wnt7a mRNA was demonstrated in some studies in LC cell lines and primary tumours [3], and elevated levels of Wnt1 and Wnt2 [4,5] have also been reported in NSCLC. NSCLC cells transformed with Wnt7a showed inhibition of anchorage independent growth [6] supporting the theory that decreased Wnt7a levels are part of the pathogenic profile of NSCLC. Furthermore, over-expression of dishevelled (Dvl), a signal transducer from Wnt receptors, Fzd-s, has been reported in 75% of NSCLC cases [7]. Down-regulation of Wnt pathway antagonists like Dkk3 [8], WIF [9,10] and sFRP [11] has also been described. When NSCLC is concerned, the well-known epithelial-mesenchymal transformation (EMT) is a characteristic feature [12] and is generally linked to increased β -catenin dependent signalling [13]. Although β -catenin mutations in LC-s are relatively rare [14–16], up-regulation of uncomplexed β -catenin without genetic alteration to β -catenin itself was shown in a high proportion of human NSCLC primary tumours and tumour cell lines [17]. Recently, comparative microarray and pathway analysis of both AC and SCC samples [18,19] have identified activation of the non-canonical Wnt signalling pathway as a main regulator of SCC development.

In the present study, the role of Wnt signalling was investigated further using primary tumours and non-cancerous lung tissues, human AC and SCC lung cancer cell lines as well as commercially available, non-cancerous, primary small airway epithelium (SAEC).

Materials and Methods

Ethics Statement

Lung tissue samples were collected during lung resections at the Department of Surgery, University of Pecs, Hungary. The project was approved by the Ethical Committee of the University of Pecs. Patients had given written consent to provide samples for research purposes. All collected samples were treated anonymously.

Cell Lines

Human lung cancer cell lines A549 (AC), and H157 (SCC) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Transgenic cell line Wnt11-A549 was created in our laboratory using lentiviral transgenesis [20].

Primary Cells and Tissues

Normal small airway epithelial cells (SAEC) were commercially available (Lonza) and were isolated from lungs of multiple random donors of different sexes and ages by Lonza.

Tumour types were determined in the Department of Pathology, University of Pecs, Hungary. A total of 20 squamous and adeno lung carcinoma samples with matched normal lung samples were obtained after surgery based on the availability of frozen tissue for molecular analysis. Samples were also formalin fixed and paraffin-embedded to be sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin (HE) for light microscopy. Following analysis, samples were grouped as SCC vs AC according to the World Health Organisation (WHO) classification [21] by a dedicated lung pathologist.

Cell Cultures

SAEC cultures were maintained at 37°C and 5% CO₂ content in a humidified atmosphere. For initial expansion primary SAEC-s were seeded onto 6-well plates (100 000 cells/well) and cultured in Small Airway Growth Medium (SAGM) (Lonza). For treatment SAEC-s were cultured in 24-well plates in SAGM. All other cell types (A549, H157, Wnt11-A549) were cultured in DMEM or RPMI supplemented with 10% FCS and were maintained at 37°C in 5% CO₂ content in a humidified atmosphere.

Recombinant Proteins, siRNA and Chemicals

Purified, recombinant Wnt11 was purchased from R&D Systems and used at two different concentrations (0.1 and 1.0 μ g/ml) for treatment of cell cultures. siWnt11 and control siRNA were obtained from Invitrogen to knock down Wnt11 expression. 100 nmol negative control and Wnt11-specific Cy3 labelled siRNA oligos were transfected into target cells using Lipofectamine 2000 transfection reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Uptake of the labelled oligonucleotides was tested using fluorescence microscopy. Cells were lysed 36 hours after transfection for RNA isolation and cDNA synthesis. qRT-PCR was used to determine Wnt11 mRNA levels in transfected samples. β -catenin inhibitor IWR-1 was purchased from Sigma, dissolved in DMSO and used at the final concentration of 1.0 μ g/ml.

Immunohistochemistry and Immunofluorescent Staining

Sections of primary lung tissues were permeabilized in PBS buffer containing 0.1% saponine and 5% bovine serum albumin for 30 minutes then incubated in primary anti-Wnt11 (AbCam),

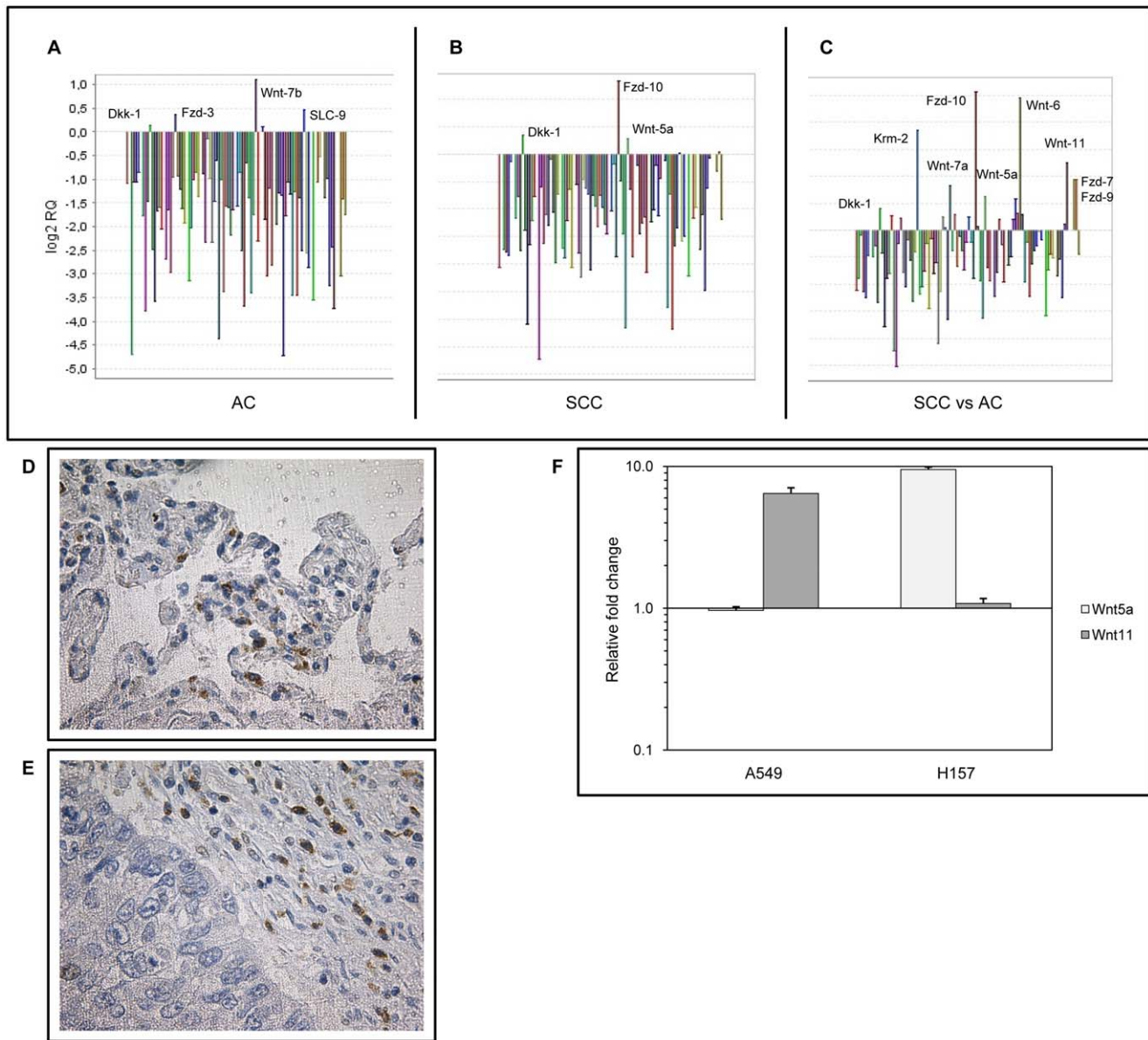


Figure 1. Level of Wnt signalling molecules in AC and SCC. Pooled cDNA of 12 AC, 8 SCC samples were targeted to gene expression analysis using a commercially available Taqman array. Four housekeeping genes were used (18S, GAPDH, HPRT1, GUSB). **A:** Expression profile of AC. Pooled cDNA of autologous normal tissue samples of the same AC patients served as reference. Note the increased level of the canonical Wnt-7b, and the receptor Fzd-3. (For the list of all gene expression changes see Table S1). **B:** Gene expression levels of SCC. Pooled cDNA of autologous normal tissue samples of the same SCC patients served as reference. Note the upregulation of the non-canonical Wnt5a and the canonical pathway inhibitor Dkk-1, along with increased level of Fzd-10 gene expression. (For the list of all gene expression changes see Table S2). **C:** Gene expression of SCC compared to AC. Note the increased level of non-canonical Wnts (Wnt5a and Wnt11), several receptors (Fzd-7, -9, -10), a canonical pathway inhibitor (Dkk-1) and an inhibitory receptor (Krm2). (For the list of all gene expression changes see Table S3). **D and E:** Immunohistochemical staining of primary control (Panel D) and AC (Panel E) tissues for Wnt11. Note the higher Wnt11 expression in the tumours emphasizing the relative nature of the initially identified differences at mRNA level. Images shown are representatives of three independent stainings. **F:** Wnt11 gene transcription was also measured in an AC (A549) and an SCC (H157) cancer cell line. Note the higher Wnt11 levels in the observed cancer cell lines compared to the normal, non-cancerous pulmonary epithelium (SAEC). The AC cell line showed a more pronounced increase in Wnt11 expression than the SCC cell line. (The results are representative of three independent experiments where the non-cancerous control (SAEC) was derived from three individual donors of different ages).

doi:10.1371/journal.pone.0057393.g001

then in anti-rabbit-HRP secondary antibodies for 1 hour each. To ensure the comparability of expression levels, all images were captured with the same exposition settings. For β -catenin staining of SAEC, normal A549, Wnt11-A549 and H157 cells: 10000 cells/cm² were seeded and cultured for 24 h on 4-well culture slides (BD-Falcon). The monolayer cell cultures were

fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton-X and 5% BSA. Murine anti- β -catenin IgG₁ mAb (Santa Cruz) (1:50) and donkey anti-murine IgG secondary antibody conjugated to NorthernLight 557 (R&D Systems) (1:200) were used for immunofluorescent labelling; nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired

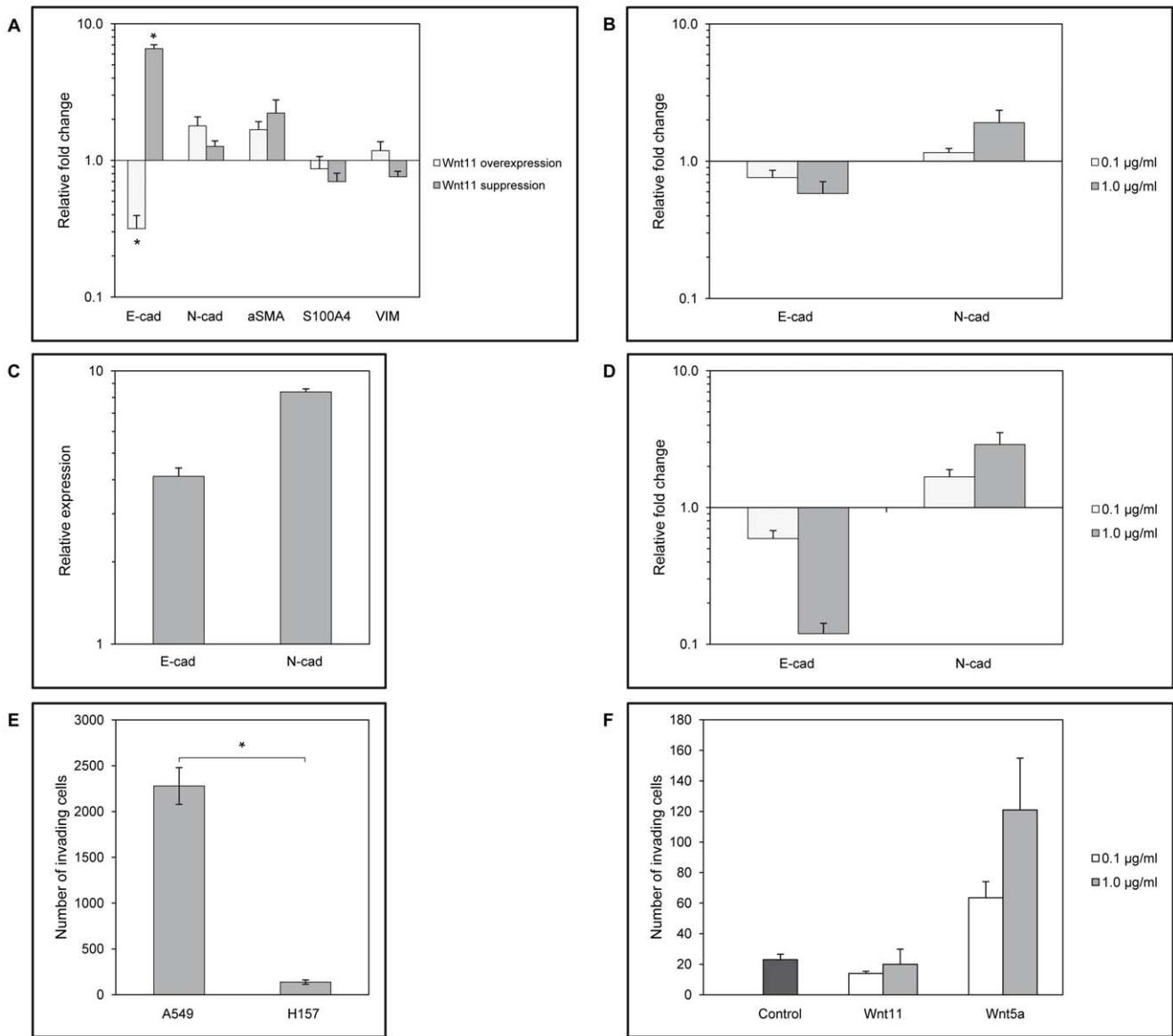


Figure 2. Effects of Wnt11 and Wnt5a in tumour development. **A:** Effects of Wnt11 overexpression and suppression in A549 AC cell line. Gene expression of A549-GFP and A549 treated with control siRNA served as reference, respectively. Note the decreased expression of E-cadherin in Wnt11-A549 ($p < 0.011$), and the increased E-cadherin level following siWnt11 treatment ($p < 0.006$). **B:** Recombinant Wnt11 treatment of SAEC cultures. Gene expression of untreated control cells was used as reference. Note the concentration dependent “cadherin switch” upon rWnt11 treatment. (Data are representative of five independent experiments where SAEC was used of five individual donors of different ages and sexes). **C:** Expression of E- and N-cadherin in primary adenocarcinoma lung tissue sample compared to its healthy autologous control pair. Data are representative of the analysis of three independent tissue pairs. **D:** Recombinant Wnt5a treatment of SAEC cultures. Gene expression of untreated control cells was used as reference. Note the concentration dependent “cadherin switch” upon rWnt5a treatment. (The presented data are representative of five independent experiments where SAEC was used as control of five individual donors of different ages and sexes). **E:** Invasion assay. The A549 AC cell line that expresses high levels of Wnt11 is more invasive than the H157 SCC cell line with lower expression of Wnt11 ($p < 0.008$). **F:** Invasion assay. Primary non-cancerous SAEC were treated with 1 µg/ml rWnt11 and rWnt5a for three days prior to the assay. Only the rWnt5a treated SAEC migrated faster than the non-treated control cells. (The results are representative of three independent experiments where SAEC was used from three individual donors of different ages). doi:10.1371/journal.pone.0057393.g002

using an Olympus IX-81 light and fluorescent or a confocal microscope, then densitometry was performed.

RNA Isolation, Preparation of cDNA, TaqMan Array and quantitative RT-PCR

Total RNA was prepared from cell cultures and primary lung resections (SCC and AC samples and their respective non-

cancerous controls) using NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel) with on-column DNase digestion. cDNA was prepared from RNA samples with MMuLV reverse transcriptase kit (Thermo Scientific). Real-time quantitative RT-PCR examinations were carried out using Absolute QPCR SYBR Green Low ROX master mix (ABGene) and an Applied Biosystems 7500 thermal cycler system. The sequences and data of primers are listed in Table 1.

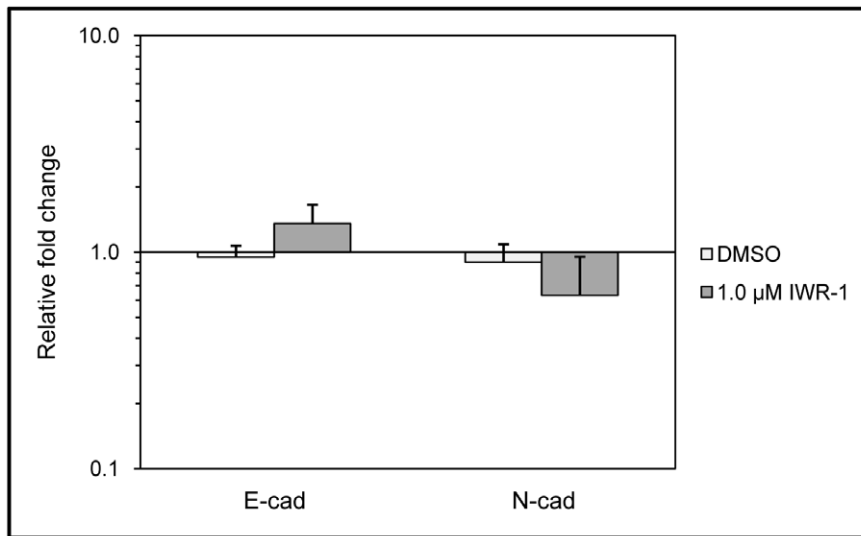


Figure 3. Effects of β -catenin inhibition on cadherin gene expression. Suppression of canonical Wnt signalling in SAEC using 1 μ g/ml IWR-1 inhibitor or DMSO as diluent control. Gene expression of non-treated SAEC was used as reference. Note the increased E-cadherin and decreased N-cadherin mRNA expressions. (The results are representative of three independent experiments where SAEC was used from three individual donors of different ages).

doi:10.1371/journal.pone.0057393.g003

Quantitative real-time RT-PCR data were analyzed by delta Ct (dCt) and Relative Quantity (RQ) methods as suggested by Applied Biosystems using the 7500 System SDS Software. Briefly, Ct values were determined for each sample using an automatic threshold level determined by the 7500 System SDS Software. Delta Ct (dCt) values were determined according to the following formula: $dCt(\text{target gene}) = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{housekeeping gene})$. Changes in gene expression are shown as RQ values calculated using the formula below: $RQ = 2^{-ddCt}$, where ddCt values were calculated as $ddCt = dCt(\text{sample}) - dCt(\text{reference sample})$.

TaqMan[®] Array Human WNT Pathway 96-well Plate (4414100)—the gold standard of specificity and sensitivity in real-time PCR was purchased from Applied Biosystems. The array also contained 4 housekeeping genes including 18S, β -actin (ACTB), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

Matrigel Invasion Assay

A549, H157, SAEC, rWnt5a (0.1 and 1.0 μ g/ml) and rWnt11 (0.1 and 1.0 μ g/ml)-treated SAEC were used in the invasion assays. SAEC were pre-treated with rWnt5a and rWnt11 for 72 hours before tested in the invasion assay. Cells were cultured in DMEM/RPMI/SAGM, respectively supplemented with 10% FCS and were maintained at 37°C in 5% CO₂ content in a humidified atmosphere. Invasion assays were carried out in 24-well Matrigel invasion chambers (BD BioCoat Matrigel) with 8.0- μ m filter membranes. After rehydration of the chambers, membranes were transferred to the wells containing 750 μ l of DMEM/RPMI/SAGM supplemented with 10% FCS as a chemoattractant. Cells (5×10^4) in 500 μ l of FCS- or growth-factor-free DMEM/RPMI/SAGM were added into each of the chambers. After 24 hours incubation the non-invading cells on the upper side of the chamber membranes were removed. The invading cells to the opposite side of the chamber membranes were fixed in 4% paraformaldehyde and were stained using hematoxylin-eosin. The total number of invading cells was determined by counting the number of cells that migrated to the lower surface of

the filters. Five separate microscopic fields were counted on each membrane.

Statistical Analysis

Where it is applicable, data are presented as mean \pm standard deviation (SD), and the effects between various experimental groups were compared with the Student t-test. $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

Wnt Signalling Molecules are Differentially Expressed in AC and SCC

Using a commercially available Wnt Taqman array system, differences between canonical and non-canonical Wnt pathway activities were studied in AC and SCC samples, respectively. Sample pairs included pooled cDNA of primary AC (12) or SCC (8) samples and their respective tissue autologous, non-cancerous controls. The read-outs were matched to all four housekeeping genes of the array to focus on the largest of differences in gene expression.

Increased transcription of the canonical Wnt-7b ligand and a Wnt receptor Fzd-3 was detected in pulmonary AC-s along with drastic down-regulation of canonical pathway inhibitors (Figure 1A). In contrast, activation of the non-canonical Wnt5a and canonical pathway inhibitor Dkk-1 along with up-regulation of Fzd-10 gene transcripts were measured in SCC samples (Figure 1B).

When gene expression profiles of non-cancerous control tissues of the two different tumour types were compared, no characteristic genes or molecular patterns were identified as potential initiators of AC or SCC development (data not shown).

However, comparative analysis of AC and SCC tumour samples emphasized additional differences between the two NSCLC subtypes. Much higher levels of an additional non-canonical Wnt, Wnt11, several receptors (Fzd-7, -9, Fzd-10) as well as increased levels of canonical pathway inhibitor Dkk-1 and

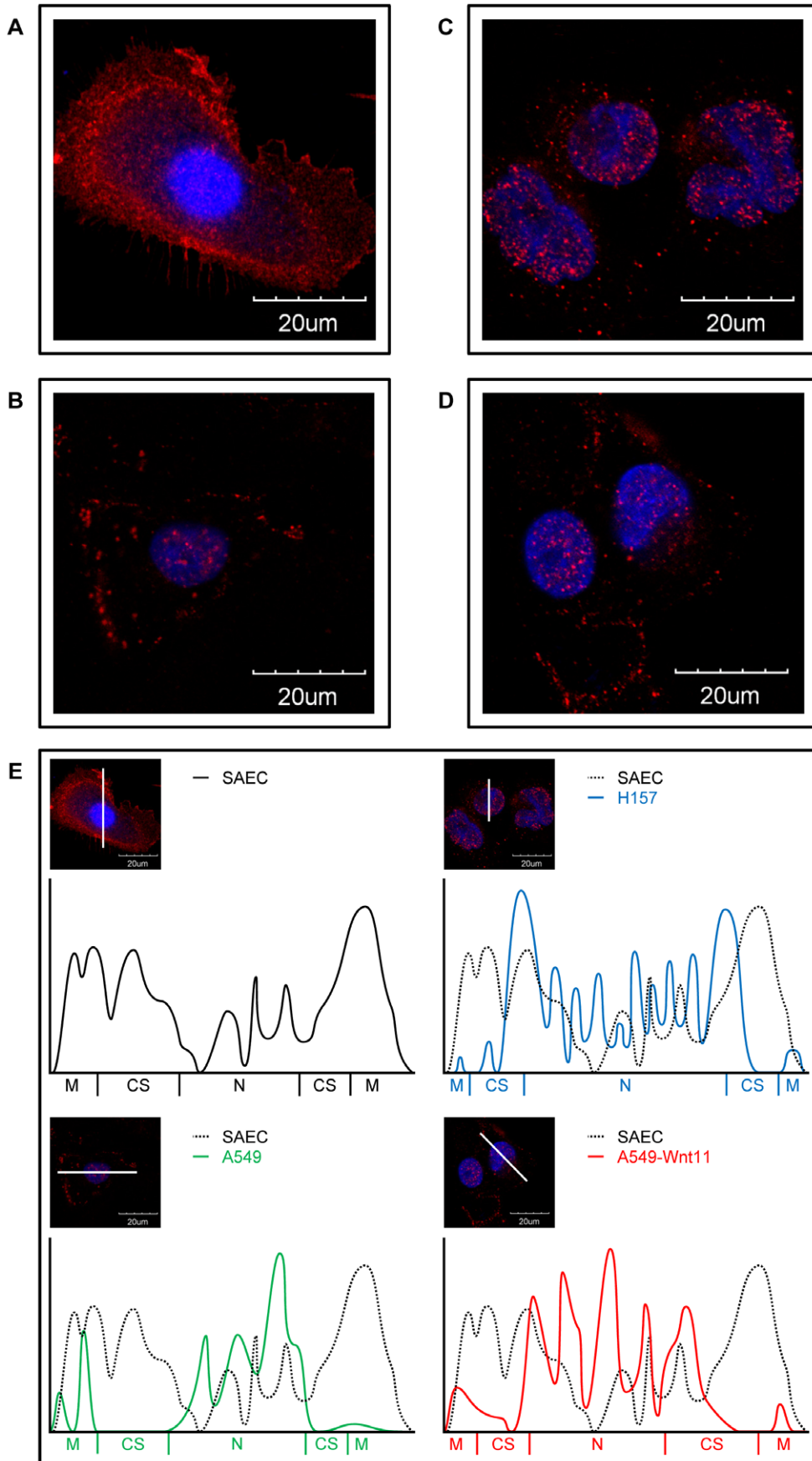


Figure 4. Localization of β -catenin. **A:** Immunofluorescent staining of SAEC. **B:** Immunofluorescent staining of normal A549. **C:** Immunofluorescent staining of Wnt11 overexpressing A549. **D:** Immunofluorescent staining of H157 monolayer cell cultures. (60x image, red: β -catenin, blue: DAPI). Note the dramatic increase in nuclear localization and the decrease in cellular membrane localization of A549 AC, Wnt11-A549 and H157 SCC cell lines compared to the normal pulmonary epithelium (SAEC). Data presented are representative of three independent experiments. **E:** Densitometry of immunofluorescent images of SAEC, A549, Wnt-11-A549 and H157 cells. Note the increased nuclear localization of β -catenin particularly in the Wnt11-A549 cell line. (M: cellular membrane, CS: cytosol, N: nucleus). doi:10.1371/journal.pone.0057393.g004

inhibitory receptor Kremen (Krm2) were detected (Figure 1C) in SCC.

Although up-regulation of the non-canonical Wnt pathway has been identified in previous studies as a general trend in gene expression alterations during SCC development, the precise role for specific molecules in the carcinogenic process has rarely been defined. One of the enigmatic molecules in the carcinogenic process of SCC is Wnt11. As Wnt11 up-regulation in SCC was detected only as relative to AC, we theorized that Wnt11 might have some general role in tumorigenesis. To investigate whether Wnt11 protein is present in ACs, AC samples were tested for Wnt11 protein expression. Primary non-cancerous control (Figure 1D) and AC (Figure 1E) tissues were stained for Wnt11 using immunohistochemistry. Wnt11 was detected in both normal and cancerous samples, although at higher levels in the tumours. The results emphasized that Wnt11 is necessary for the normal homeostasis of the tissue and its increased expression in the tumour correlates with the carcinogenic process. The relative nature of Wnt11 expression was further confirmed, when Wnt11 gene transcription was measured in an AC (A549) and an SCC (H157) cancer cell line. While Wnt11 levels were higher in both A549 and H157 than in normal, non-cancerous SAEC, several fold increase was detectable in Wnt11 mRNA expression in the AC (Figure 1F) than in the SCC cell line.

To find out more about the role of Wnt11 and potentially Wnt5a in the carcinogenic process, further studies were performed.

Wnt11 and Wnt5a in NSCLC

To examine the role of non-canonical Wnts in LC development, first Wnt11 levels were modified in the A549 cell line using lentiviral transgenesis for overexpression and commercially available siWnt11 for transient suppression of Wnt11 (Figure S1).

As in a limited number of previous studies Wnt11 has been implicated as a regulator of EMT (Zhang, JBC, 2012), several EMT molecular markers including S100, α SMA, and VIM were measured. Only E- and N-cadherin mRNA levels changed significantly in Wnt11 overexpressing-A549 cells (Figure 2A), drastically decreasing E- and increasing N-cadherin expression. In contrast, transient inhibition of Wnt11 translation using siWnt11 could only increase E-cadherin mRNA transcription while N-cadherin levels remained unchanged implicating E-cadherin as a Wnt11 target (Figure 2A). To test whether Wnt11 has a similar effect in primary pulmonary epithelium, SAEC-s presenting mixed epithelial phenotypes (Figure S2) were treated with different concentrations (0.1 and 1.0 μ g/ml) of purified recombinant Wnt11. The experiments provided further evidence that Wnt11 regulates cadherin levels (Figure 2B) as E-cadherin expression decreased, while N-cadherin mRNA levels increased in Wnt11 treated SAEC-s in a concentration dependent manner. To investigate E- and N-cadherin expression in AC-s where Wnt11 protein levels are higher than in their non-cancerous autologous controls (Figure 1D and E), qRT-PCR analysis was performed. In the Wnt11 enriched environment of AC-s, both E- and N-cadherin levels were higher than in the non-cancerous control tissues (Figure 2C) indicating Wnt11 as a regulator of cadherin

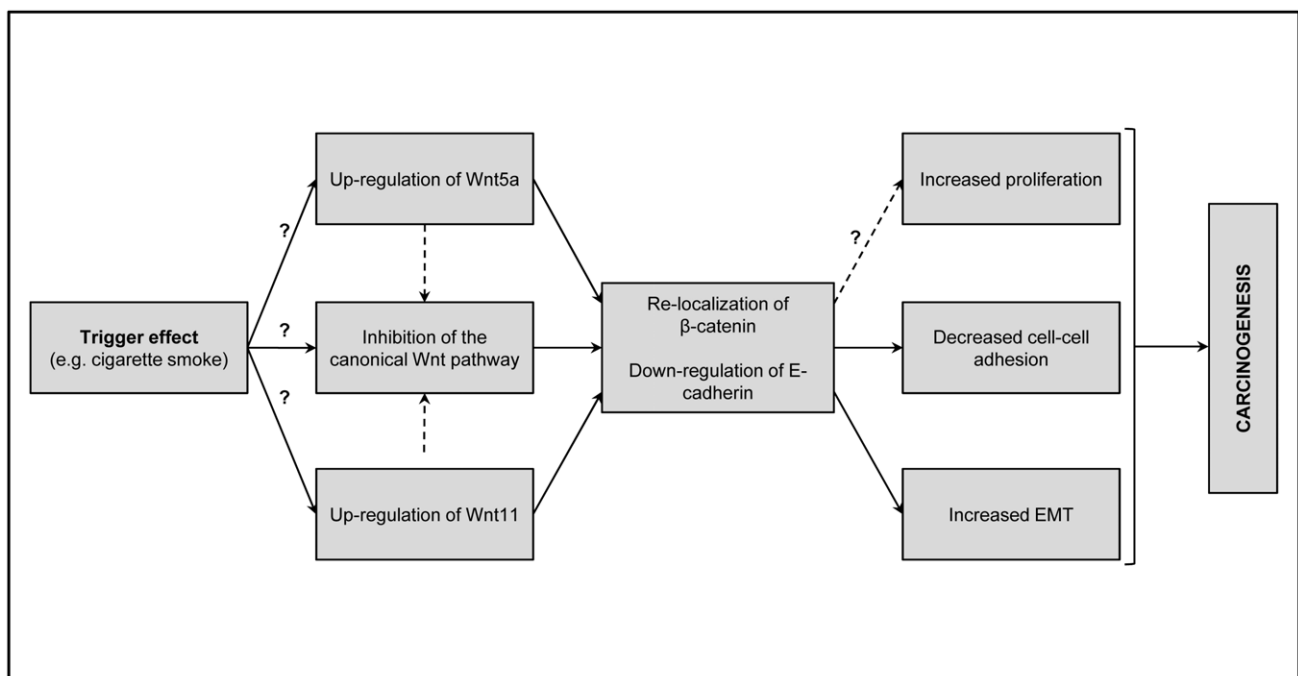


Figure 5. Predicted molecular pathway interactions during SCC development.

doi:10.1371/journal.pone.0057393.g005

expression and emphasizing the regulatory role of additional factors present in the molecular microenvironment of the tissue. Based on the literature [22] Wnt5a and Wnt11 can support or even replace one another *in vivo* while controlling tissue development and functions, therefore the effect of Wnt5a was also tested on E- and N-cadherin expression. Similarly to rWnt11, rWnt5a (0.1 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was able to down-regulate E- and up-regulate N-cadherin expression in primary SAEC (Figure 2D).

To investigate whether added Wnt11 or Wnt5a can modulate E- and N-cadherin expression in LC cell lines, both A549 and H157 cell lines were exposed to rWnt5a and Wnt11 at the concentration of 0.1 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Added rWnt5a to AC cell line was able to further decrease E-cadherin, and had no significant effect on N-cadherin, while rWnt5a had no significant effect on either genes in the H157 cell line. Added rWnt11 in the H157 SCC cell line increased N-cadherin expression and had no effect on the already non-detectable E-cadherin levels (Figure S3).

As current literature concerning the role of Wnt5a and Wnt11 in cadherin regulation [23,24] and therefore in cellular motility is contradicting, an invasion assay was performed, where non-treated primary SAEC, rWnt5a and rWnt11 treated SAEC as well as A549 AC and H157 SCC cells were tested (Figure 2E, 2F). In the invasion assay the A549 cell line that expresses Wnt11 at high levels moved much faster than the H157 cell line that highly expresses Wnt5a (Figure 2E). In contrast, rWnt5a treated non-cancerous SAEC were more invasive than the rWnt11 treated SAEC which were not moving faster than the controls (Figure 2F), indicating that primary, non-cancerous cells might require additional signals or longer exposure to Wnt11 to achieve increased motility.

Inhibition of Canonical Wnt Signalling and β -catenin Localization

In the TaqMan array of SCC samples, apart from up-regulation of non-canonical Wnt-s, suppression of canonical Wnt signalling was also detected that might have an important role in modulating the tissue's microenvironment.

As the Wnt11 promoter contains two conserved Tcf/LEF binding sites and two conserved GATA sites, canonical Wnt signals and GATA family members can regulate Wnt11 transcription directly. In contrast, the Wnt5a promoter region harbours numerous *cis*-acting elements including several GC boxes and Sp1, AP1, and AP2 binding motifs [25]. To test how β -catenin activity affects Wnt11 and Wnt5a expression as well as cadherin mRNA levels, cells were treated with a β -catenin inhibitor, IWR-1 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hours. Inhibition of β -catenin function resulted in increased expression of E- and reduced N-cadherin expression (Figure 3), while both Wnt11 and Wnt5a transcription was slightly reduced (data not shown).

Additionally, β -catenin is not only important in the regulation of gene transcription but also in cellular adhesion. β -catenin associates with the cytoplasmic domain of cadherin and directly links to the actin cytoskeleton through α -catenin in a dynamic cadherin adhesion complex. Localization of β -catenin protein therefore was investigated in primary, non-cancerous SAEC (Figure 4A), A549 AC cell line (Figure 4B), Wnt11-A549 (Figure 4C) and an SCC cell line, H157 (Figure 4D). Cells were stained for β -catenin using protein specific antibody and the nucleus with DAPI, then staining intensity was scanned in a cross-section of the cells (Figure 4E). In the normal pulmonary epithelium, SAEC, β -catenin staining was strong in the cellular membrane and not in the nucleus indicating that β -catenin acts primarily in cellular adhesion and much less of the protein is involved in forming a transcription complex. In contrast, dramatic

increase was detected in nuclear localization of β -catenin in Wnt11-A549 AC and in the H157 SCC cell lines while no significant amount of β -catenin was detected in their cellular membranes indicating severely weakened cellular adhesion.

Discussion

Malfunction of genes and pathways controlling developmental processes have long been studied in association with cancers. Malfunction of Wnt related events have frequently been singled out as one of the causes of carcinogenesis. While Wnts seem to be important in the carcinogenic process of LC-s also, the complex molecular background of mixed LC types has been notoriously difficult to decipher.

Recent studies, including our TaqMan analysis, confirmed a differential molecular background to NSCLC sub-types AC-s and SCC-s involving up-regulation of canonical signalling in AC-s [26] and increased non-canonical Wnt signalling in SCC-s. While these results should be sufficient enough to identify additional therapeutic targets that could aid development of effective therapies, the underlying molecular complexity of AC and SCC works against this goal. In the present study we aimed to provide further details to the molecular background of pulmonary carcinogenesis and to connect individually observed molecular alterations during the process.

Similarly to previous studies, our experiments detected a marked increase in Wnt5a levels in SCC. As Wnt5a is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis [27] increased tissue mass of tumours with high Wnt5a levels is understandable. Interestingly, the role of Wnt5a in carcinogenesis is still ambiguous, as it can exhibit tumour suppressor activities in some cancers, like thyroid, brain, breast and colorectal, but is aberrantly up-regulated and associated with tumour progression in cancers of the lung, stomach and prostate. Increased Wnt5a levels in SCC samples might also be significant as an inducer of LC, as cigarette smoke extracts [28] trigger Wnt5a expression in various types of exposed tissues including macrophages and cells of epithelial origin. Comparative analysis of gene expression in AC and SCC tumour tissues has additionally identified Wnt11 and its receptor Fzd-7 [29] as potential regulators of SCC development. However, while the increase in Wnt5a levels was specific to SCC, the Wnt11 increase was only relative to AC. Similarly to SCC, AC-s had also shown up-regulated Wnt11 levels indicating a general role for Wnt11 in the carcinogenic process. Our studies using primary pulmonary epithelial tissues as well as cell lines identified Wnt5a and Wnt11 as regulators of cadherin expression, most likely the "cadherin switch" that is a characteristic marker of tumour progression. Our studies also confirmed that the effects of both Wnt5a and Wnt11 are concentration dependent and presumably modified by additional microenvironmental signals. Perhaps even a combination of Wnt5a/Wnt11 in SCC and Wnt7b/Wnt11 in AC. The additional signals could also include for example different levels of Wnt11 receptor Fzd-7 in NSCLC sub-types that was detected in the AC and SCC samples (unpublished observations), as well as activators of e.g. the SP1, AP1 or AP2 transcription factors that could modify Wnt5a transcription. As Wnt5a can also activate gene transcription via AP1, SCC tumour development might be associated with an auto-regulatory loop of Wnt5a. According to the literature, Wnt5a dependent E-cadherin down-regulation, however, is independent of the canonical Wnt pathway in melanoma type skin cancer and favours the PKC dependent up-regulation of a transcriptional repressor, Snail [30]. Addition to modification of cadherin expression, both Wnt5a and Wnt11 adjusted β -catenin localization, redirecting β -catenin from cellular

adhesion foci to the nucleus. The fact that Wnt11 can loosen cellular adhesion is not a novel concept. Previous studies have found that Wnt11 can promote ubiquitination and therefore degradation of the focal adhesion protein paxillin supporting turnover of focal adhesions which process is required for cell migration [31].

As an additional factor, a general down-regulation of canonical Wnt signalling was also detected in SCC. To investigate the potential significance of canonical Wnt pathway suppression, β -catenin was chemically inhibited in cell lines and in primary pulmonary epithelial cells, then Wnt5a and Wnt11, E- and N-cadherin expression was studied. While Wnt11 and Wnt5a levels were slightly suppressed upon β -catenin inhibition, E-cadherin was up- and N-cadherin was down-regulated. While the outcomes of the above experiments are in agreement with previous description of non-canonical Wnt signalling regulation, it doesn't provide explanation for our results of primary tissues where up-regulation of non-canonical Wnts with parallel down-regulation of the canonical Wnt pathway was detected. Although further studies are essential, our observations in primary tumours are not unique in lung SCC, as a similar molecular pattern was detected in non-melanoma type, squamous cell skin cancer [32] also.

While the main molecular trends in AC and especially in SCC development are apparent, gene expression changes that are currently unexplained might hold the key to effective therapeutic design. Unfortunately, detailed analysis of all identified molecular alterations has gone way beyond the scope of the present study one can still hypothesise about important future directions of the investigation. In contrast to SCC for example, development of AC is orchestrated by de-regulation of canonical Wnt pathway suppressors and up-regulation of Wnt7b, a lung epithelium-linked Wnt [33,34]. It has also been determined that Wnt7b promoter activity is regulated by a homeo-domain transcription factor, TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1) [33], responsible for alveolar epithelial development, indicating that mutation or malfunction of TTF1 might be responsible for AC-type carcinogenesis. Emphasizing the complex regulation of LC development, increased mRNA expression of Fzd-3, a natural receptor for Wnt5a [35] was also detected in AC-s, rather than in SCC although the significance of this finding is unclear. Meanwhile, Fzd-10, a receptor for Wnt7a [36–38] as well as Wnt7b [38] showed an increase in SCC. Whether Fzd-10 up-regulation is a sign of compensatory attempt for inhibited canonical Wnt signalling is awaiting further experimentation. Additionally, high levels of Wnt6 were also detected in SCC samples. Based on studies in human gastric cancer (GC) cells, WNT6 was able to increase resistance to apoptotic cell death induced by chemotherapeutic agents and enhance resistance of GC cells to anthracycline drugs [39]. Whether Wnt6 is involved in regulation of drug resistance in LC remains to be seen. Based on the summary of present findings one potential target in lung SCC therapy could involve AP1 induced gene transcription using the dominant negative c-jun as transcriptional repressor as in the transgenic TAM67 (dominant-negative c-Jun) mouse model both skin [40] and lung cancer tumour progression was successfully inhibited as a result of interference with Wnt5a signalling [41].

In summary (Figure 5) we theorize that cigarette smoke triggers up-regulation of Wnt5a that initiates proliferation and aids suppression of canonical Wnt signalling that leads to decreased participation of β -catenin in cellular adhesion. Increased Wnt11 ratio decreases cellular adhesion even further by suppressing E-cadherin expression, by reducing β -catenin molecules in anchorage function and by inducing degradation of the focal adhesion protein paxillin.

Although further studies are clearly required, by highlighting the overlapping function of molecular pathways of LC-s, our work has provided additional facts to aid better understanding of the molecular background of NSCLC sub-types which might help development of curative therapies in the future.

Supporting Information

Figure S1 Wnt11 overexpression and suppression in A549 cells. A549 pulmonary adenocarcinoma cells were transfected with a lentiviral bicistronic construct encoding full-length Wnt11-IRES-GFP. Control A549 cells were transfected with GFP only. **A:** Quantitative RT-PCR measurement of Wnt11 mRNA levels in A549 and Wnt11-A549 cells. **B:** Detection of Wnt11 protein by Western blotting. A549 cells were lysed in SDS sample buffer containing 10% 2-ME and heated for 5 minutes at 95C. Then SDS-PAGE was performed and proteins were blotted onto nitrocellulose membrane. Membrane was blocked in TBS containing 2% BSA and 0.1% Tween 20. Rabbit anti-Wnt11 pAb (Abcam) and mouse anti- β -actin mAb (Sigma) primary antibodies were used. HRP labelled antibodies specific for rabbit and mouse IgG, respectively, were used as secondary reagents. Blots were visualized using the chemiluminescent Supersignal Kit (Pierce). **C:** transfection efficiency of cy3 labelled siRNA-s was monitored using fluorescence microscopy. **D:** Quantitative RT-PCR measurement of Wnt11 mRNA levels in control and siWnt11-A549 cells. (TIF)

Figure S2 Expression profile of various epithelial markers in SAECs. mRNA levels of SAEC were measured with qRT-PCR for the following types of epithelial markers of commercially obtained SAEC: AQP3: Aquaporin 3 (NM_004925, AGCCCCTTCAGGATTTCCA-GACC-CAAATTCGGTTCCA, 86 bp); AQP4: Aquaporin 4 (NM_004028, GCGAGGACAGCTCCTATGAT-ACTGGTGCCAGCATGAATC, 110 bp); AQP5: Aquaporin 5 (NM_001651.2, CCCTGCGGTGGTCATGA-ATGGGCCC-TACCCAGAAAAC, 60 bp); MUC-1: Mucin 1, cell surface associated (NM_001204286.1, CTCATTGCCTTGCTGTCTGT-GATGTC-CAGCTGCCCGTAGT, 57 bp); FOXJ1: Forkhead box protein J1 (NM_001454, CGAGGCACTTTGATGAAGC-CAACTTCTGCTACTTCCGCC, 110 bp); CC10: Clara cell 10 (NM_003357.4, CGAGGCACTTTGATGAAGC-CAACTTCTGCTACTTCCGCC, 135 bp). Relative β -actin was used as the normalizer gene (SD from duplicate readings). The results indicated a mixed phenotype of SAECs. The present figure is a representative of three separate tests. (TIF)

Figure S3 rWnt treatment of A549 and H157 cell lines. **A:** rWnt5a treatment of the A549 AC cell line. Note the decreased expression of E-cadherin and the slight increase in N-cadherin expression. **B:** rWnt11 treatment of the H157 SCC cell line. Note the lack of E-cadherin and increased N-cadherin expression. **C:** rWnt5a treatment of the H157 SCC cell line. Note the lack of E-cadherin and increased N-cadherin expression. (TIF)

Table S1 Comparative analysis of primary lung adenocarcinoma (AC) samples to their tissue autologous controls. (DOCX)

Table S2 Comparative analysis of primary lung squamous cell carcinoma (SCC) samples to their tissue autologous controls. (DOCX)

Table S3 Comparative analysis of primary lung squamous cell carcinoma to adenocarcinoma samples. (DOCX)

References

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *Cancer J Clin* 55: 74–108.
- Pongracz JE, Stockley RA (2006) Wnt signaling in lung development and diseases. *Respiratory Res* 7: 15.
- Calvo R, West J, Franklin W, Erickson P, Bemis L, et al. (2000) Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12776–12781.
- He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, et al. (2004) A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 6: 7–14.
- You L, He B, Xu Z, Uematsu K, Mazieres J, et al. (2004) Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cell. *Oncogene* 23: 6170–6174.
- Winn RA, Marek L, Han SY, Rodriguez K, Rodriguez N, et al. (2005) Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. *J Biol Chem* 280: 19625–19634.
- Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, et al. (2003) Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 22: 7218–7221.
- Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, et al. (2001) Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 19: 117–121.
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stocher R, et al. (2003) WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* 201: 204–212.
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, et al. (2004) Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 64: 4717–4720.
- Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, et al. (2004) Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 23: 6672–6676.
- Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, et al. (2003) Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 94: 593–597.
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, et al. (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 179: 56–65.
- Sunaga N, Kohno T, Kolligs FT, Fearon ER, Saito R, et al. (2001) Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 316–321.
- Ueda M, Gemmill RM, West J, Winn R, Sugita M, et al. (2001) Mutations of the beta- and gamma-catenin genes are uncommon in human lung, breast, kidney, cervical and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 85: 64–68.
- Blanco D, Vicent S, Elizegi E, Pino I, Fraga MF, et al. (2004) Altered expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis. *Lab Invest* 84: 999–1012.
- Akiri G, Cherian MM, Vijayakumar S, Liu G, Bafico A, et al. (2009) Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 28: 2163–2172.
- Hu Y, Galkin AV, Wu C, Reddy V, Su AI (2011) CAFET algorithm reveals Wnt/PCP signature in lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 6: e25807.
- Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Thu KL, Garnis C, et al. (2010) Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. *PLoS Med* 7: e1000315.
- Bovia F, Salmon P, Matthes T, Kvell K, Nguyen TH, et al. (2003) Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 101: 1727–1733.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y (2001) The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18: 1059–1068.
- Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg CA (2000) WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood* 96: 4132–4141.
- Medrek C, Landberg G, Andersson T, Leandersson K (2009) Wnt-5a-CKI{alpha} signaling promotes {beta}-catenin/E-cadherin complex formation and intercellular adhesion in human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 284: 10968–10979.
- Arnsdorf EJ, Tummala P, Jacobs CR (2009) Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One* 4: e5388.
- Danielson KG, Cohen IR, Huebner K, Nicholls JM, Iozzo RV (1995) Characterization of the complete genomic structure of the human WNT-5A gene, functional analysis of its promoter, chromosomal mapping, and expression in early human embryogenesis. *J Biol Chem* 270: 31225–31234.
- Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH-F, Kim JY, Kris MG, et al. (2009) WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* 138: 1–12.
- Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, et al. (2009) WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 583–589.
- Hussain M, Rao M, Humphries AE, Hong JA, Liu F, et al. (2009) Tobacco Smoke Induces Polycomb-Mediated Repression of Dickkopf-1 in Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 69: 3570.
- Kim GH, Her JH, Han JK (2008) Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *J Cell Biol* 182: 1073–1082.
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, et al. (2007) The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282: 17259–17271.
- Iioka H, Imemura S, Natsume T, Kinoshita N (2007) Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility. *Nat Cell Biol* 9: 813–821.
- Pourreyyon C, Reilly L, Proby C, Panteleyev A, Fleming C, et al. (2012) Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical Wnt signalling is repressed. *PLoS One* 7: e31827.
- Weidenfeld J, Shu W, Zhang I, Millar SE, Morrissey EE (2002) The Wnt7b promoter is regulated by TTF-1, GATA6, and Foxa2 in lung epithelium. *J Biol Chem* 277: 21061–21070.
- Shu W, Jiang YQ, Lu MM, Morrissey EE (2002) Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development* 129: 4831–4842.
- Kawasaki A, Torii K, Yamashita Y, Nishizawa K, Kanekura K, et al. (2007) Wnt5a promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell Signal* 19: 2498–2506.
- Carmon KS, Loose DS (2008) Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res* 6: 1017–1028.
- Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Nohno T (2000) Involvement of frizzled-10 in Wnt-7a signaling during chick limb development. *Dev Growth Differ* 42: 561–569.
- Wang Z, Shu W, Lu MM, Morrissey EE (2005) Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5. *Mol Cell Biol* 25: 5022–5030.
- Yuan G, Regel I, Lian F, Friedrich T, Hitkova I, et al. (2013) WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene* 32: 375–387.
- Kang MI, Baker AR, Dextras CR, Cabarcas SM, Young MR, et al. (2012) Targeting of Noncanonical Wnt5a Signaling by AP-1 Blocker Dominant-Negative Jun When It Inhibits Skin Carcinogenesis. *Genes Cancer* 3: 37–50.
- Tichelaar JW, Yan Y, Tan Q, Wang Y, Estensen RD, et al. (2010) A dominant-negative c-jun mutant inhibits lung carcinogenesis in mice. *Cancer Prev Res* 3: 1148–1156.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JEP DB DRT. Performed the experiments: DB VC AW EK SB TK MA VKS JR KK LJ MN TFM TL. Analyzed the data: DB VC TL TFM MN DRT JEP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JEP DRT TFM MN. Wrote the paper: DB VC JEP.