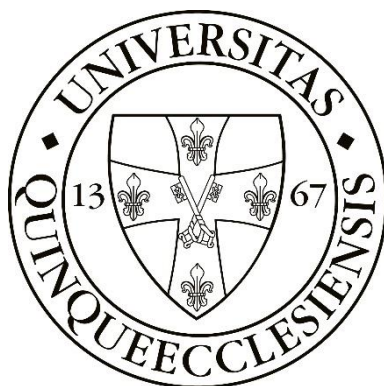


**A WNT JELÁTVITEL SZEREPE NEM KISSEJTÉS TUDÓRÁK  
KIALAKULÁSÁBAN ÉS TERÁPIÁJÁBAN**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**



**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**

## **BEVEZETÉS**

### **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 mind a férfiak mind a nők esetében vezető haláloknak számít világszerte a daganatos megbetegedések között. A nem kissejtes tüdőkarcinómán belül három főbb hisztológiai csoportot lehet elkülöníteni: adeno (AC) -, laphám (SCC) és nagysejtes karcinóma (LC). A tüdőrák előfordulása összekapcsolható az életkor növekedésével, magyarországi adatok szerint a 2015. évben regisztrált betegek kevesebb, mint 1%-a 40 év alatti, míg 76%-ban a 60 év feletti korosztályt érinti. A tüdőkarcinóma kialakulásának kezdeti szakaszában a beteg tünetmentes, a diagnózis felállításakor azonban már legtöbbször előrehaladott, nem operálható állapotú tumor azonosítható. A 2015. évi magyarországi betegadatok alapján az újonnan nyilvántartásba vett betegek 44%-át a legsúlyosabb IV. stádiumban diagnosztizálták. Nem kissejtes tüdőrákon belül a leggyakrabban előforduló kórkép az AC, amelyet az SCC követ. Korai felismerése rendkívül fontos, a betegség korai szakaszában a sebészeti beavatkozás az elsődleges terápia, ebben az esetben az 5 éves túlélési ráta 43-50% között mozog, amely a későbbi stádiumokban drasztikusan csökken. A legsúlyosabb esetet leíró IV. stádiumban lévő betegek esetében a metasztázisok kezelésére a kemoterápia az egyetlen lehetőség.

A konvencionális kemoterápia mellett egy külön csoportot alkotnak az úgy nevezett célzott terápiás szerek. A hisztológiai besorolás alapján történő kezelés mellett egyre jelentősebb szerepet tulajdonítanak a tüdőkarcinómát érintő „driver” mutációknak. Míg az AC betegcsoport jellemezhető KRAS, EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) mutációkkal és ALK átrendeződéssel, addig e mutációk nem találhatóak meg az SCC esetekben. Az aktiváló EGFR mutációkkal rendelkező betegpopulációban az EGFR intracelluláris részében elhelyezkedő tirozin-kináz domaint gátló erlotinib és gefitinib hatékonyan növelni tudta a progresszió nélküli állapotot. Az ALK átrendeződéssel azonosítható betegeknél alkalmazható már egy, az amerikai gyógyszerengedélyezési hatóság, az FDA (Food and Drug Administration) által jóváhagyott szer, a crizotinib. A fent említett két mutáció jellemzően a nem dohányzó, AC hisztológiával diagnosztizált betegpopulációra jellemző, míg a kaukázusi etnikumban leggyakrabban előforduló (13-26%) KRAS mutációs státusz tipikusan dohányzással asszociált. Jelenlegi ismereteink szerint nincs célzott terápia a KRAS mutációval rendelkező betegek számára.

A két említett karcinómatípus nem csak mutációk szintjén különbözik, a tumorban található erek és a tumor vérellátottsága is eltérő. Az érképzés segítségével a tumornövekedés felgyorsulhat, segítségével megnő a metasztázisok képződésének a kockázata. Így nem meglepő, hogy a legszélesebb körben vizsgált célzott terápia középpontjában a tumor érképződésének gátlása áll.

### **Érképzés gátlók alkalmazása az onkológiában**

A fiziológias körülmények között megismert szerepe mellett a VEGF-A molekulát a patológiás érképzés fő regulátoraként tartják számon. Normál szöveti környezetben az inhibitorok és

aktivátorok kiegyenlítik egymást, koncentrációjukban bekövetkező változás azonban a tumor érzékelésének kedvez. A tumor tehát a fejlődése során érzékelést indukálhat, azonban az egészséges szövetekkel ellentétben a tumor abnormális erekkel rendelkezik. Az az elképzelés, hogy az angiogenezist terápiás célpontként alkalmazzák, Judah Folkmantól származik az 1970-es évekből. Az eredeti koncepció óta számos megközelítés látott napvilágot. 2004-ben, az első humanizált anti-VEGF monoklonális antitest, vagyis a bevacizumab jóváhagyásával kezdetét vette az anti-VEGF terápia klinikai alkalmazása vastagbél karcinómák esetében.

Alkalmazása hamar kiterjedt többek között nem kissejtes tüdőrákra is, azonban a kezelésre adott válasz eltérő a két fő nem kissejtes tüdőrák altípusban. Míg az AC csoportba tartozó betegek megnövekedett túlélést mutatnak, addig az SCC betegek súlyos vérzéssel járó tüneteket produkáltak. A súlyos mellékhatások háttérében több mechanizmus állhat. Az említett két hisztológiai típus intratumorális érhálózatában leírt különbségek vagy az SCC altípusra jellemző alacsony pericita szám okozta gyengébb erek mind növelhetik a vérzés kialakulásának a valószínűségét. A jelenlegi vélekedés szerint a VEGF útvonal vagy a VEGF molekula kizárólagos gátlása nem elegendő, ugyanis a tumorsejtek könnyen képesek alternatív útvonalakon keresztül érzékelés indukálására. Ezen megfigyelésekből kiindulva az angiogenezisben szerepet játszó egyéb útvonalak feltérképezése és együttes gátlása sikert hozhat a daganatellenes terápiában.

### **PPARgamma szerepe a tumorok kialakulásában**

A PPAR molekulák a magi hormon receptorok (NHR) családjába tartozó transzkripciós faktorok. Az 1990-es évek elején, rágszálakon végzett kísérletek alapján írták le először ezt a molekulacsaládot, mint a peroxiszóma proliferációt indukáló magi receptor molekulákat. A PPAR-ok fontos molekuláris szabályozói a sejt zsírtárolásának és metabolizmusának, de közvetlenül is kapcsolatba hozható a daganatok kialakulásával. A PPARgamma 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 betegcsoportban apoptózist indukálnak. 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. A PPARgamma az érhálózat minden sejttípusában kimutatható, azaz endotélsejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, monociták/makrofágok mind expresszálnak PPARgammát, természetes ligandjai angiogenezis gátló hatást közvetítenek.

### **Wnt5a és az angiogenezis**

A Wnt jelátvitel egy evolúciósan konzervált rendszer, mely legalább három útvonalon keresztül szabályozhatja a sejtek osztódási képességét, polaritását vagy akár a migrációját. Tüdő onkogenezisben betöltött szerepét is igazolták már. Pacheco-Pinedo és munkatársai kimutatták, hogy a tüdőtumorkra jellemző Kras mutációt hordozó egértörzsekben a Wnt expresszió emelkedett és aktiválódása együtt jár a megnövekedett tumorképződés valószínűségével. Molekuláris szinten három fő Wnt jelátviteli útvonalat különíthetünk el, a beta-katenin függő kanonikus, valamint a nem-kanonikus PCP („planar cell polarity”) és  $Ca^{2+}$  függő utakat. A Wnt5a molekulát a nem-kanonikus Wnt jelátviteli út egyik komponenseként írták le, mely

elsősorban a  $Ca^{2+}$  útvonalon keresztül fejt ki hatását. Az angiogenezis szereplőit tekintve a Wnt5a fokozza az endotélsejtek osztódását és túlélését. Szerepe ugyanakkor nem csak a fiziológiás 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. Tüdő SCC daganatokban a Wnt5a overexpresszió együtt jár a stróma VEGF-A expressziójával, ami a tumor agresszivitásának megnövekedését és ezzel együtt kedvezőtlen prognózist von maga után. A fenti eredményekre hivatkozva vetették fel korábban, hogy a bevacizumab kezelés megoldást jelenthet a Wnt5a pozitív nem kissejtes tüdőrák altípusokban. A későbbi eredmények azonban ellentmondók voltak, hiszen az angiogenezist célzó anti-VEGF terápia SCC esetén súlyos mellékhatások kialakulásához vezetett.

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

## **CÉLKITŰZÉSEK**

- 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?*
- 2. Befolyásolja-e a kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulák hatására megváltozott mikro környezet a PPAR $\gamma$  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 érhálózatának alakulásában nem kissejtes tüdőkarcinómák AC és SCC altípusainak esetében?*

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Primer sejtek**

A 3 dimenziós in vitro tüdőmodell összeállításához különböző donoroktól származó (Lonza, Basel, Svájc) primer, normál sejteket használtunk, normál kislégúti epitélsejtet (SAEC), normál tüdő fibroblaszt sejtet (NHLF) és normál mikrovaszkuláris endotélsejtet (HMVEC-L). VEGF-A overexpresszáló sejt vonal létrehozásához humán fibroszblaszt sejt vonalat alkalmaztunk. LiCl, IWR-1 hatásának bizonyításához A549 humán AC sejt vonallal végeztük a kísérleteket.

### **3D in vitro tüdőmodell**

A normál primer sejteket tenyésztettük, majd miután a 80%-os konfluenciát elérték, tripszines emésztés segítségével sejt szuszpenziót készítettünk mindhárom sejt típusból. Ezt követően meghatározott arányban (30% SAEC, 30% HMVEC-L, 40% NHLF vagy 40% F11) összekevert sejt szuszpenziót 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% CO<sub>2</sub>) tartottuk.

### **Humán minták**

A humán tüdőminták 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.

### **Kísérleti állatok**

A kísérletek során konvencionális körülmények között tartott C57BL/6 és PPAR $\gamma$  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.

### **Génexpressziós vizsgálatok**

Génexpresszió vizsgálathoz a primer tüdőtumorokból és a sejt kultúrákból RNS izolálást követően cDNA-t készítettünk. A kísérletek során HighROX SensiFast SYBR Green Master Mixet (BioLine, London, UK), Taqman Wnt array plate-t, Taqman microRNA assay-t használtunk, az amplifikációt pedig ABI StepOnePlus készüléken futtattuk. Az analízist a hozzá tartozó StepOne szoftverrel végeztük.

### **Immunfluoreszcens és hematoxin-eozin festés**

Metszésre történő beágyazásához a szövetekből 0,5 x 0,5 cm-es darabot, illetve 3 dimenziós tüdőszövetek esetében a szferoidokat szintén beágyazó médiumot tartalmazó metszettartó kazettába tettük és a felhasználásig -80°C-on tároltuk. A festésekhez a 8  $\mu$ m vastagságú metszeteket kriosztáttal készítettük (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany). A fixálás után a metszeteket 20 percig rehidratáltuk és blokkoltuk 5% BSA tartalmú PBS oldattal. Ezt követően az elsődleges antitesttel jelöltük 1 órán át. A nem közvetlenül jelölt antitestekhez háromszori PBS oldatos mosást követően AlexaFluor 488 és 555 konjugált 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.

Hematoxin-eozin festéshez 8  $\mu$ m vastag tüdőmetszetek 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. Mosást követően Vectashield fedőoldattal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük és a Nikon Eclipse Ti-U inverz mikroszkóppal fotóztuk.

### **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 jelentésében lumineszcens

jelet eredményező oxyluciferinné alakítja. PPAR aktiváció méréséhez BrightGlo luciferáz assay-t (Promega, Madison, USA) alkalmaztunk, melyet Synergy HT (BioTek) olvasóval detektáltunk. A fehérje termelésében bekövetkező változások követésére a transzfektált sejteken 72 órás LiCl (10mM) és IWR-1 (1 $\mu$ m) kezelést alkalmaztunk. A kezelés befejezését követően a fehérje transzport megállítására Brefeldin-A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 10  $\mu$ g/ml-es koncentrációjú oldatával kezeltük 4 órán át, mivel a VEGF-A szolubilis faktor. VEGF-A molekulát tisztított VEGF-A antitesttel és AlexaFluor 488 konjugátummal kapcsolt anti-egér másodlagos IgG-vel vizualizáltuk immunfluoreszcens jelölés során.

### **PPARgamma agonista és antagonistá kezelés**

F11 fibroblaszt sejteket 24-lyukú lemezen tenyésztettük és 10  $\mu$ m roziglitazonnal (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) és 10  $\mu$ m GW9662-vel (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) kezeltük 48 órán át 1  $\mu$ 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.

### **HMVEC-L migrációs kísérlet**

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

### **Áramlási citometriás mérés**

3 dimenziós tüdőmodellek elkészítését követően a modelleket (3D SAEC-F11 VEGF<sup>high</sup>-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 Accumax<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oldat segítségével egysejt-szuszpenziót készítettünk. Natív AC és SCC minták esetében az enzimátikus emésztést szintén Accumax<sup>TM</sup> (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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 citométer készülékkel (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium), az analízist FCS Express V3 szoftverrel végeztük.

## **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.

## **EREDMÉNYEK**

### **VEGF-A expresszió a tüdőben**

Az egészséges fiatal és idős tüdőminták mellett humán nem kissejtes tüdőtüdőminták, azon belül AC és SCC esetében is megvizsgáltuk az angiogén faktorok kifejeződését. A VEGF-A molekula mRNS szintje az idős tüdőmintákhoz hasonlóan mindkét tumortípus esetében szignifikánsan magasabb, a PPARgamma pedig szignifikánsan alacsonyabb a normál, egészséges tüdőhöz képest. 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.

### **A Wnt jelátvitel vizsgálata nem kissejtes tüdőrákban**

A Wnt jelátvitel tumorigenezisben betöltött ismert szerepe miatt megvizsgáltuk a Wnt jelátviteli molekulák expresszióját AC és SCC betegmintákon. A primer tumor analízisünk során kimutattuk, hogy a jellemzően nem-kanonikus Wnt5a mind mRNS mind fehérjeszinten szignifikánsan magasabb szinten van jelen SCC mintákban, mint az AC betegekben.

### **A kanonikus Wnt jelátvitel és PPARgamma kapcsolata**

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a Wnt és PPAR útvonalak módosítása milyen hatással van a VEGF-A termelésre. Egy VEGF-A termelő tüdőtüdőmintát, az AC eredetű A549 vonalat használva Wnt jelátvitel gátlásán, illetve indukálásán keresztül vizsgáltuk a PPARgamma aktivitását. PPAR kötőhelyet tartalmazó PPRE plazmiddal transzfektált sejtekben a beta-katenin jelátviteli utat aktiváló LiCl kezelés hatására a PPAR promóter aktivitás szignifikánsan csökkent, míg a kanonikus Wnt inhibitorként használt IWR-1 kezelés után az aktivitás nem változott szignifikánsan. Ezzel párhuzamosan a VEGF-A mRNS szintje mindkét esetben növekszik, míg fehérjeszinten a változás ellenkező irányú, vagyis LiCl hatására a VEGF-A szintje szignifikánsan emelkedik, IWR-1 kezelést követően pedig nem változik jelentősen. PPARgamma KO egér tüdőtüdőmintáinak Wnt5a festése szintén az aktivitás fontosságát hangsúlyozza, mivel a PPARgamma ilyen rendszerben történő alul működése nem jár a Wnt5a molekula fehérjeszintű változásával.

### **Wnt5a indukálta miR-27b szabályozó szerepe a PPARgamma expresszióban**

A fent leírt kísérleteink szerint csak a beta-katenin függő, kanonikus jelátvitel csökkenti a PPARgamma 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 mintákban miként váltanak ki hasonló mechanizmust. A mikroRNS-ek szinte minden sejszintű folyamat szabályozásában szerepet játszanak, így az angiogenezisben is. Irodalmi adatok egyértelműen összekapcsolják a miR-27b és miR-200b molekulákat a Wnt, PPARgamma és VEGF-A jelátvitellel, így az említett molekulákat primer humán tüdőmintákon vizsgáltuk. Az AC betegekben szignifikánsan alacsonyabb szintet mutatott mindkét mikroRNS az SCC-hez képest. 3D in vitro tüdőmodellt az SCC-re jellemző Wnt5a molekulával kezelve azt tapasztaltuk, hogy a miR-27b szintet szignifikánsan emelte, míg a miR-200b-re nem volt hatással. Fibroblaszt sejteken 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 eseteknél tapasztaltakkal.

### **Wnt5a szerepe a endotélsejtek proliferációjában**

A továbbiakban az SCC mintákra jellemző Wnt5a molekula érképzésben betöltött szerepét vizsgáltuk. A 3D tüdőmodelleket rekombináns humán Wnt5a molekulával kezeltük és három angiogénikus faktor, a VEGF-A, az IL-1beta és a HIF-1alfa mRNA expresszióját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egyik molekula kifejeződésében sem volt szignifikáns eltérés. Az endotélsejtek proliferációját jellemző CD105 markert primer humán tüdőmintákon analizálva azt tapasztaltuk, hogy az AC esetében a CD105 szignifikánsan magasabb szinten mutatható ki. 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 mRNA szintje drasztikusan emelkedett. 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, 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, mind pedig a két nem kissejtes tüdőrák altípusnál, nem elegendő az endotél proliferáció indukálásához. 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 kezelésre ez a hatás szignifikánsan nem változik. A fentiekből elmondható, hogy a Wnt5a közvetlenül nem szabályozza az angiogenezishez kapcsolódó gének expresszióját mRNA szinten, illetve az endotélsejtek VEGF-A által indukált proliferációját sem módosítja.

### **Kadherineik expressziója nem kissejtes tüdőrák mintákban**

A kadherin molekulaegyensúly megváltozása a tumoros folyamatok egyik meghatározó jellemzője. A Wnt5a primer humán epitélsejtben megváltoztatja a kadherineik expressziós profilját. Az E-kadherin szintjét csökkenti, míg az N-kadherint növeli a rekombináns Wnt5a molekula. Ezt követően az angiogenezis vizsgálatában a figyelmünket az endotélt 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 emelni képes.

### **Wnt5a szerepe a sejt migrációra**

Előzetes eredményeinkből következtetve a Wnt5a nincs közvetlen hatással az angiogenikus 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 vizsgáltuk. A festések jól mutatják, hogy normál VEGF-A szint jelenlétében az endotélsejtek diffúzan vannak jelen a 3D szferoidban, míg a fibroblasztok által 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. A Wnt5a endotélsejtekre gyakorolt gátló hatását bizonyítandó HMVEC-L primer endotélsejtek migrációját vizsgáltuk. A függesztett sejtenyésztő betétbe kitett 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.

### **TÉZISEK**

- 1. Az érékezés 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 megfigyeltekkel. 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 tüdőmodellben vizsgálva kimutattuk, hogy serkenti az endotélsejtek proliferációját és migrációját.

- 2. Befolyásolja-e a kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulák hatására megváltozott mikrokönyezet 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 érékezés 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-kenatin, illetve kanonikus Wnt jelátvitel függő folyamat, melynek következtében emelkedik a VEGF-A molekula expressziós szintje, ami az AC esetében megfigyelt molekuláris

mintázatot magyarázza. Az SCC betegmintákban 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 érhálózatának 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.

## PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Összesített impakt faktor: **10,55**

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: **5,032**

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. **Rapp, J**, Kiss, E., Meggyes, M, Szabó-Meleg, E, Feller, D, Smuk, G, Laszlo, T, Sarosi, V, Molnar, TF, Kvell, K, Pongracz, JE: Increased Wnt5a in squamous cell lung carcinoma inhibits endothelial cell motility. BMC Cancer, 16:915 (2016). IF: **3,265**
2. D. Bartis, V. Csöngéi, M. Advicevic, E. Kiss, A. Weich, T. Kovacs, V.J. Souza, **J. Rapp**, K. Kvell, L. Jakab, T.F. Molnar, D.Thickett, T. László, J. E. Pongrácz: 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) p. e57393 (2013). IF: **3,534**. A dolgozatban a cikk eredményei részben kerültek felhasználásra, ennek megfelelően az impakt faktorok megállapításánál **1,767** került beszámításra.

### Egyéb publikáció

1. M. Vesel, **J. Rapp**, D. Feller, E. Kiss, L. Jaromi, M. Meggyes, Gy. Miskei, B. Duga, G. Smuk, T. Laszlo, I. Karner, J. E. Pongracz: ABCB1 and ABCG2 drug transporters

are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. *Respiratory Research*, közlésre elfogadva (2016). IF: **3,751**

### **Egyetemi jegyzet**

1. György Z Miskei, **Judit Rapp**, Edit Kiss, Tamás Kovács, Judit E Pongrácz: Basic and Complex Cell and Tissue Culture Techniques for Biotechnology Students University of Pecs, [www.medbiotech.com](http://www.medbiotech.com); 2014 PTE

### **A dolgozat alapjául szolgáló 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. Pongrácz: 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.

### **A dolgozat alapjául szolgáló konferencia poszterek**

1. **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.
2. **Judit Rapp**, Veronika Csöngői, Tamás Kovács, Monika Avdicevic, Edit Kiss, Krisztián Kvell, Judit E. Pongrácz: Successful in vivo vascularization of in vitro engineered lung tissues. IMPULSE EFIS-EJI Symposium, Mátraháza, 2013. Augusztus 31-Szeptember 03.
3. **Judit Rapp**, Veronika Csöngői, Tamás Kovács, Monika Avdicevic, Edit Kiss, Krisztián Kvell, Judit E. Pongrácz: Successful induction of in vivo vascularization of in vitro engineered lung tissues. 2nd Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013. szeptember 11-12.
4. **Judit Rapp**, Veronika Csöngői, Tamás Kovács, Monika Avdicevic, Edit Kiss, Krisztián Kvell, Judit E. Pongrácz: Generation of vascularized in vitro lung construct- a novel

therapeutic implication of engineered tissue constructs. Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlés, Pécs, 2013. Október 16-18.

5. **Judit Rapp**, Edit Kiss, Monika Avdicevic, Tamás F. Molnár, Veronika Sárosi, Gábor Smuk, Judit E. Pongrácz: Evaluation of CLEC14A and ROBO4 expression in non-small cell lung carcinoma patients following Bevacizumab and cisplatin treatment. 12th ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal, 2014. Március 21-23.
6. **Judit Rapp**, Diána Feller, Edit Kiss, Monika Avdicevic, Veronika Sárosi, Tamás F. Molnár, Judit E. Pongrácz: Angiogenesis is normal and cancerous lung – in vitro studies using primary tissues and a human 3D lung tissue model. 2nd Tissue Models and Drug Screening Conference, Berlin, Germany, 2015. Május 5-7.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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.