

# **A LIMFANGIOLEIOMIOMATÓZIS MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZÁSA**

**PhD Tézisek**

**Dr. Elhousseiny Mohamed Mahmoud Abdelwahab**  
**PharmD, MSc**

**PhD Témavezető: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet**

**PhD Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea**

**Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia**



**Pécsi Tudományegyetem**  
**Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet**  
**Gyógyszerésztudományi Kar**  
**Pécsi Tudományegyetem**

**2019**

## Bevezetés

A limfangioleiomiomatózis (LAM) ritkán előforduló, lassan előrehaladó, fatális szisztémás betegség, amely főleg fiatal nőket érint. A LAM-ot atipikus simaizom sejt (SIS)-szerű sejtek burjánzása jellemzi a tüdőben, nyirokrendszerben és a lágy szövetekben. Az atipikus SIS-szerű sejtek fokozott osztódása ciszták képződését váltja ki a tüdőben, mely folyamat pneumothoraxhoz és a tüdő kollapszusához vezethet. Régebben a LAM-ot jóindulatú betegségnek tartották, azonban ma az ilyen cisztaképző sejtosztódást lassan növekvő metasztázáló neoplazmának tartjuk. A LAM paciensek szenvedése a betegség előrehaladtával fokozatosan növekszik. A LAM világszerte ritka betegség, incidenciája 1-9/1 000 000 Európában az incidencia sokkal magasabb, a LAM sporadikus formája itt 500 000 nőből 1-4-et érint. A tuberous sclerosis (TSC) gén LAM-ra jellemző mutációja Európában minden 6000-ik újszülöttnél fordul elő. A TSC mutációt hordozó emberek 30-40 %-ában alakul ki a LAM betegség felnőtt korukban. Az új, érzékeny diagnosztikai módszereknek köszönhetően a LAM betegség incidenciája világszerte emelkedik, különösen Európában. A betegek többségének (86%) szüksége van tüdő transzplantációja a diagnózist követő 10 évben.

A legtöbb LAM beteg légszomjjal, mellkasi nyomással, pneumothorax-szal és a mellhártyák közötti folyadékfelhalmozódással (pleurális effúzió) jelentkezik orvosánál. Ezek a tünetek nem specifikusak, ezért a LAM-ot gyakran tévesen asztmaként vagy krónikus obstruktív tüdőbetegségként (COPD) diagnosztizálják. A helytelen diagnosis eredménytelen kezeléshez vezet, mivel az asztma és a COPD kezelésére használt gyógyszerek korlátozottan hatnak a LAM tüneteire. Pontos diagnózis felállításához a vaszkuláris endotéliális növekedési factor D (VEGF-D) (800 pg/ml fölött) és a matrix metalloproteinázok (MMP) plazmakoncentrációjának mérése, valamint tüdő CT szükséges.

A LAM kialakulását okozhatja a TSC1 (hamartin) vagy a TSC2 (tuberin) gén öröklött (TSC-LAM) vagy szerzett (sporadikus, S-LAM) mutációja. A TSC1-TSC2 komplex több jelátviteli úttal lép interakcióba. Részt vesz a *mechanistic target of Rapamycin* (mTOR1) complex (mTORC1) szabályozásában a kis GTPáz Rhep aktivitásának befolyásolása által. Noha a LAM betegek szöveteinek többségében jelen van a TSC1 vagy a TSC2 mutációja, a betegek jelentős százaléka (10-15%) nem hordozza a fent említett mutációk egyikét sem. Ez azt sugallja, hogy egyéb mutációk vagy de-regulált jelátviteli utak is felelősek lehetnek a betegség kialakulásáért. Ez a lehetőség aktívan kutatott a világ számos laboratóriumában. A karakterisztikus LAM

sejtek eredete ma még ismeretlen, annak ellenére, hogy számos szöveti markert hordoznak felszínükön.

Reaktivitás az  $\alpha$ -SMA-ra és a HMB45-re, megváltozott mTOR-S6P aktivitás, és TSC1/2 mutációk mind jellemzőek a LAM sejtekre. A melanocita marker HMB45 expressziója felvetette annak a lehetőségét, hogy a LAM sejtek esetleg a *crista neuralis*-ből származnak. Mindenesetre az, hogy ciszták keletkezése jellemző a *crista neuralis*-ből származó sejtvonalakra, alátámasztja ezt a feltételezést. Egy másik hipotézis szerint a LAM sejtek a méhből származnak. Ezt a hipotézist támogatja az ER és a PR magas expressziója a LAM sejtekben, ami 30%-os korrelációt mutat az angiomiolipómával, perivaszkuláris epitelioid sejtes tumorokkal (PEComa) és mezenhimális tumorokkal, amelyek leggyakrabban a méhben fordulnak elő. Sajnos még ha ki is derül, honnan erednek a LAM sejtek, ezzel nem jutunk közelebb annak megfejtéséhez, hogyan vándorolnak a ciszták a tüdőbe és képeznek ott metasztázist.

Amikor az mTSC1/2 következtében az mTOR aktiválódik, *kétféle complex* keletkezhet: mTORC1 és/vagy mTORC2. Az mTORC1 és/vagy mTORC2 serkenti a sejtsztódást, az autofágiát, valamint a mitokondriumok metabolizmusát és biogenezisét. Jelenleg az egyetlen terápiás lehetőség az mTOR inhibitor rapamycin (Sirolimus) alkalmazása, amely képes a legtöbb beteg tüdőfunkcióit stabilizálni, de nem képes garantálni a progressziómentes túlélést. Mivel a LAM csaknem kizárólag nőket érint, néhány klinikai vizsgálat alapján bizonyos kutatók azt állítják, hogy az ösztrogén-szint stabilizálása lassíthatja a betegség előrehaladását. Habár ez a megközelítés nem vezetett sikerre, elméletünk szerint nem az alapötlet hibás, hanem a kísérleti megközelítés volt sikertelen.

Az mTOR útnak számos *up-stream* szabályozó molekulája és jelátviteli útja van, többek között növekedési faktorok, energia-depléciós mechanizmusok, oxigén-szint változás, aminosavak (leucine és arginine), gyulladáscsökkentő citokin-szint változások, ösztrogén stb. A fő mTORC1-szabályozó utak egyike az evolúciósan konzervált Wnt jelátviteli út. Jelenleg az mTOR-t szabályozó mechanizmusokat intenzíven kutatják annak reményében, hogy megértésük új és effektívebb kezelési módszereket eredményez majd.

## **Célkitűzés**

Az elvégzett kutatómunka elsődleges célja az volt, hogy hozzájáruljon a LAM molekuláris hátterének és patomechanizmusának (a TSC mutációkon túl) megértéséhez, és potenciális új terápiás célpontok azonosításához vezessen.

A munka célkitűzései három csoportba sorolhatók:

- 1- A LAM betegség hormonfüggésének vizsgálata
- 2- A Wnt jelátviteli út szerepének vizsgálata a LAM kialakulásában és progressziójában.
- 3- Olyan új drogok tesztelése, melyek ígéretesnek bizonyultak más, elsősorban nőket érintő betegségek (pl. emlőrák) kezelésében.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A **tüdőszövet minták** humán tüdő-donoroktól származtak. A minták kinyerése a Helsinkii Nyilatkozattal összhangban, a Pennsylvania-i Egyetem etikai engedélyével történt. Kísérleteinkben négy, betegekből származó sejtvonalat használtunk: LAM-100, LAM-111C, LAM-D9065, és LAM-HUP. Kontrollként primer normal humán simaizom sejtek (SIS) szolgálták (Lonza, Basel, Switzerland). Az **elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz** 90 nm vastag metszeteket használtunk. Az elektronmikroszkópok típusa: Jeol 1200 és Jeol 1400 (Jeol Ltd., Japan), az alkalmazott feszültség 80 kV volt. A képalkotás egy integrált MegaView III kamera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH; Munster, Germany) segítségével történt.

Az **áramlási citometriai** vizsgálatokat Rhodamine 123-mal (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) kezelt sejteken, FACS Canto II áramlási citométer (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) segítségével végeztük. A **fluoreszcens mikroszkópos** képalkotás Olympus IX-81 (OLYMPUS corporation, Tokyo, Japan) fluoreszcencia-mikroszkóp használatával történt. **RNS izolálásához** MN NucleoSpin RNA izoláló kitet (Macherey-Nagel, Düren, Germany) használtunk. Az RNS koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) készülékkel mértük meg. **Humán Nukleáris Receptor TaqMan®Array** és **Humán Wnt Signalling TaqMan®Array** (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A TaqMan PCR reakciót ABI StepOnePlus rendszerrel végeztük, az adatokat StepOne szoftverrel analizáltuk. MicroRNS-ek expresszióját az U6 expressziójához normalizáltuk. A **Nanostring** méréseket az nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Washington, USA) segítségével analizáltuk. **Az angiogenesis** méréséhez Human Angiogenesis Array Kit-et (R&D Systems, Minneapolis, USA) alkalmaztunk. Fehérjék koncentrációit egy fluoreszcens protein assay kit-tel (Qubit Protein, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mértük. **Kvantitatív RT-PCR-hoz** SensiFAST SYBR Green reagenst (BioLine, London, UK) használtunk. A készülék az ABI StepOnePlus system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) volt, az adatokat pedig StepOne szoftverrel analizáltuk, a  $\beta$ -aktin gén expressziójára normalizáltuk, és a  $2^{-ddCt}$  módszerrel számoltuk ki. Az *array*-ből nyert adatokat egy *feed forward* **mesterséges neuronhálózat (Artificial Neural Network, ANN)** (NeuroSolutions 6, NeuroDimension Inc.) szoftverrel értékeltük ki. A metabolizmus jellemzése (*Metabolic profiling*) *SeaHorse XF96* (Agilent Technologies, USA) és *Oroboros* (O2k, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria) platformok használatával történt. *Transwelleket* használtunk a migrációs assay-hez (Costar, Corning Incorporated, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A **TRXR aktivitást** Thioredoxin Reductase Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA, USA) segítségével mértük.

**Statistical analysis:** független mintákon végzett t-test és one-way ANOVA Bonferroni korrekcióval. Szignifikancia-szint:  $P < 0.05$ .

## **EDMÉNYEK**

### **A LAM sejtvonalak jellemzése**

A kutatásainkban használt LAM sejtvonalak (LAM100, 111c, D9065, HUP) négy, tüdő-transzplantáción átesett betegből származtak (National Disease Research Interchange (NDRI), Philadelphia, PA, USA). A TSC2 mutációt hordozó LAM sejtvonalakban a sejtek 76 %-a hiperaktív mTORC1 jelátvitelt mutatott, azonkívül gyorsabban szaporodtak, gyorsabban migráltak és invazívabbak voltak, mint a kontrollként használt, ugyanannyi passzázson átesett human primer fibroblasztok (Dr Krymskaya (Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, USA). Ezek a tulajdonságok neoplastikus sejtvonalakra jellemzőek. Két normál, egészséges tüdődonorokból izolált simaizom sejtvonalat a Lonza cégtől vásároltunk. A simaizom sejtvonalatát a gyártó tesztelte  $\alpha$ -SMA és von Willebrand Faktor (Faktor VIII) jelenlétére. A normál és a LAM betegekből származó sejtvonalak összehasonlítása során hematoxylin-eozin és  $\alpha$ -SMA IF festést alkalmaztunk. A fenti módszerek alkalmazásával nem volt kimutatható különbség a LAM és a simaizom sejtvonalak között.

A molekuláris különbségek jellemzése céljából qRT-PCR-ral vizsgáltuk a HMB-45, mTOR, TSC2 and PS6 gének expresszióját. Az így kapott eredményeket immunfluoreszcens festéssel erősítettük meg. A simaizom kontrollokhoz képest az mTOR és a PS6 gének szignifikáns ( $P < 0.05$ ) expresszió-növekedése (up-regulation) volt megfigyelhető a LAM sejtvonalakban (eredeti megfigyelés: Dr Krymskaya et al). Ezenkívül a TSC2 gén expressziójának teljes megszűnése volt megfigyelhető a LAM sejtvonalakban. Mivel a TSC1/2 gének esszenciálisak az mTOR jelátviteli út szabályozásában, a megfigyelés, hogy a TSC2 gén nem expresszálódott a LAM sejtvonalakban, nagyon lényeges volt abban, hogy a betegekből származó sejtvonalatokat alkalmasnak ítéltük, hogy a LAM betegség modelljei legyenek.

## **A LAM molekuláris hátterének feltérképezése: a nukleáris receptorok, a vaszkularizáció és a miRNS-ek deregulációja**

Az ösztrogén hormon kétféle receptoron keresztül befolyásolja a sejt metabolizmusát. Az egyik típus sejtmembránhoz kötött (Estrogen Receptor A, ERA) a másik a sejtmagban található (Estrogen Receptor B, ERB). Nukleáris Receptor Array kísérletet végeztünk két *poolozott* kontroll simaizom sejtvonalon és négy *poolozott*, betegekből izolált LAM sejtvonalon. A LAM sejtvonalakban a 92 vizsgált gén közül 21-nek emelkedett, 30-nak csökkent az expressziója a kontroll bronchiális simaizom sejtvonalakban mérhetőhöz képest. A nukleáris receptor TaqMan array és az azt követő, minden sejtvonalon külön elvégzett qRT-PCR analízis kimutatta a progeszteron receptor (PGR) és a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor 1-beta (PPARGC1B) gének expressziójának szignifikáns emelkedését ( $P < 0.001$ ) és az ösztrogén related receptor gamma (ESRRG) gén expressziójának jelentős emelkedését ( $P < 0.05$ ). Ismert, hogy a PPARGC1B szabályozza az ösztrogén receptor alpha (ERA), a nukleáris respiratorikus faktor 1 (NRF1) és a glükokortikoid receptor (GR) gének expressziójának mértékét. Ezeknek a géneknek az expressziója több mint hétszeresére nőtt a vizsgált LAM sejtvonalakban. A PPARGC1B expressziójának növekedése kapcsolatba hozható a mitokondriumok számának emelkedésével, az aktív PRG 4 izoforma pedig a megemelkedett mitokondriális membrán-potenciállal és sejtlégzéssel, míg az ESRRG a mitokondriumok biogenezisére és az energia-metabolizmusra van hatással. A szignifikánsan csökkent expresszójú gének között található az NR5A2 és a retinsav receptor beta (RARβ). A RARβ a tiroid-szteroid hormone-receptorok szupercsaládjába tartozik, és mindkét gén fontos szerepet játszik a sejtek szaporodásának gátlásában és differenciálódásuk stimulálásában. Az adatok ANN analízise erős korrelációt tárt fel több retinsav receptor között (RARβ, RXRβ, RXRG). Ezek mindegyike képes a biológiailag aktív A vitamin és a PGR kötésére. A nukleáris receptor gének expressziójának a betegekből származó sejtvonalakban kimutatható változásai a mitokondriumok LAM-ban játszott jelentős szerepére mutatnak, egységbe foglalva a korábbi kutatások eredményeit, melyek szerint a LAM sejtek mTOR aktiváció által stimulált szaporodása az energia-metabolizmus nagymértékű átrendeződését igényli. A NADP-függő oxidatív foszforiláció helyett a LAM betegek mitokondriumai – a más tumorokban is megfigyelhető – aerob glikolízist hasznosítják (Warburg effektus). Az energia-metabolizmus ilyen változásai óhatatlanul a hypoxia-indukálta factor 1 alfa (hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1-alpha)) expressziójának növekedéséhez ( $P < 0.05$ ), majd ennek következményeként a VEGF expresszió növekedéséhez vezetnek. Ennek további

alátámasztásaként a qRT-PCR analízis és az angiogenesis protein array a LAM diagnosztikus markereként ismert VEGFC és VEGFD expressziójának erős emelkedését mutatta ki ( $P < 0.001$ ). A thrombospondin-1 (TSP1) szint csökkenése és a CXCL16 kemokin peptid szint emelkedése szintén megfigyelhető volt a LAM mintákban.

Ezek a megfigyelések különösen érdekesek, mivel a TSP1 a mitokondriumok biogenezisének egy ismert inhibitora, a CXCL16 pedig a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) sejtek invázióját szabályozza. Az angiogenesis-array adatok ANN analízise erőteljes asszociációt mutatott ki a CXCL1 és TSP1 expressziója az egyik oldalon, valamint a fibroblaszt növekedési factor (FGF), Endothelin1, SerpinE1 és VEGFC expressziós szintjei között. Az utóbbi négy molekula részt vesz a vaszkularizáció stimulációjában és a miofibroblaszt fenotípus indukciójában. Ezek a hatások önmagukban is képesek a tüdő regenerációs képességének csökkentésére.

A Nanostring chip metodológia használatával végzett további vizsgálatok a tumor szuppresszor miR125b-5p és az alacsony sűrűségű lipid oxidáció indukálta autofágia-regulátor miR155-5p expressziójának csökkenését mutatták ki LAM-ban. Az apoptózist indukáló miR15b-5p expressziója csökkenést, míg a sejtek túlélését és proliferációját indukáló miR-199a/b-3p expressziója növekedést mutatott a LAM-os mintákban.

A fent ismertetett adatokra alapozva megállapíthatjuk, hogy úgy tűnik, a mitokondriumok nem megfelelő működésének szerepe van a LAM betegség progressziójában.

### **A mitokondriumok diszfunkciója a LAM betegségben**

Elektronmikroszkópos képalkotás segítségével kimutatható, hogy a normál simaizomsejtek és a LAM sejtvonalak mitokondriumainak morfológiája drasztikusan különbözik egymástól. A LAM sejtek mitokondriumai kisebbek, sötétebbek és olyan elektron-denzek voltak, hogy a belső membrán krisztái nem voltak láthatóak. A gén-profil adatok támogatják ezt a megfigyelést. Az NRF1 gén egy dimerizáló protein transzkripció faktor kódol, amely a sejtosztódáshoz, respirációhoz, valamint a mitokondriális DNS transzkripciójához és replikációjához szükséges metabolikus géneket szabályoz. A PPARGC1B gén expressziójához köthető NRF1 gén expressziója LAM sejtekben többszöröse volt a kontroll bronchiális simaizom sejtekben megfigyelhetőnek. A PPARGC1B a felelős a mitokondriumok nem-adrenerg-mediálta biogenezisének fenntartásáért a megnövekedett oxigén-fogyasztáson, zsírfelhasználáson és nem-oxidatív glükóz-metabolizmuson keresztül, valamint az



energiatermelés szabályozásáért. Az itt szerepet játszó anyagcsere-utak a HIF1 szint növekedése és a VEGF géncsalád tagjai expressziójának növekedése.

A “mitokondriális egészség” további markerei is jelentős változáson mennek át. A mitokondriális transzkripciós factor A (TFAM), amely kritikus fontossággal bír a mitokondriális DNS-repair-ben és replikációban, megnövekedett expressziós szintet mutatott a LAM sejtvonalakban a normál kontroll bronchiális simaizom sejtekhez képest. Úgy tűnik, a transzkripciós szintekben megfigyelhető változások hatással vannak a mitokondriumok működésének minden aspektusára. Mind a Cyto C (citokróm complex), amely a mitokondriumok belső membránjában elhelyezkedő protein, az electron-transzport lánc esszenciális komponense, mind a Cox4 (citokróm c oxidáz, az oxigén redukciójának katalizátora) mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott.

A továbbiakban a sejtmembránon áthaladni képes, kationos, zöld fluoreszcens festékkel, a Rhodamine-123-mal (RH-123) végzett áramlási citometriát, valamint az Oroboros és a Seahorse műszereket használtuk a mitokondriumok működésének részletesebb analizésére. A mitokondriumok energizálása az RH-123 fluoreszcenciájának kioltását indukálja. A fluoreszcencia kioltásának (quenching) sebessége arányos a mitokondrium membrán-potenciáljával. A fent leírt analízis eredményeként megállapíthatjuk, hogy a LAM sejtek mitokondriumainak membrán-aktivitása kétszer magasabb a normál bronchiális simaizomsejtek mitokondriumaiban mérhetőnél. Ezzel ellentétben, megnövekedett glikolízis és csökkent oxidáció volt megfigyelhető a LAM sejtek Seahorse és Oroboros technológiákkal végzett metabolikus analizise során. Első látásra ezek a biokémiai eredmények ellentmondásosnak tűnhetnek, azonban redukzív stress hatására, amikor az elektron-akceptorok várhatóan redukált állapotban vannak, némely redox fehérjék ezek helyett az oxigénnek adhatnak át elektront. Ez a folyamat növelni tudja a reaktív oxigén-származékok (ROS) termelését a mitokondriumban annak ellenére, hogy egyidejűleg a ROS-eket eltakarító rendszerek aktivitása is nő. Például a normálisan antioxidáns mátrix NADPH reduktázok, valamint a glutation reduktáz és tioredoxin reduktáz (TrxR) folytathatja a hidrogén-peroxid termelését azáltal, hogy elektronok szökhetnek át (leaking) redukált flavoproteinjeiktől az oxigénhez. Ez a nettó mitokondriális ROS túlsordulás (spill-over) oxidatív sérülést okozhat és súlyosan károsíthatja a mitokondriumokat. A folyamatot, mely során a sejt eltávolítja a károsodott vagy diszfunkciális mitokondriumokat, mitofágiának nevezzük. A mitofágia folyamatának bármely károsodása abnormális mitokondriális funkcióhoz vezethet. Ennek az elméletnek a tesztelése céljából összehasonlítottuk a normál kontroll bronchiális simaizom

sejtekben és a LAM sejtvonal sejtjeiben mérhető TrxR aktivitást. A LAM sejtekben mérhető TrxR aktivitás szignifikánsan magasabbnak bizonyult a normál bronchiális simaizom sejtekben mérhetőnél.

Érdekes, hogy korábbi beszámolók szerint a Trx2-TrxR2 rendszer az auranofin, egy redox enzimeket gátló aranykomplex anti-angiogenikus hatásának célpontja. Az auranofin erős affinitása a tiol és szelenol csoportokhoz a redox enzimek, mint a TrxR, gátlásán keresztül módosíthatja a mitokondriumok redox egyensúlyát. Saját eredményeinkre és a fent említett irodalmi beszámolóra alapozva felállítottuk azt az elméletet, hogy a TrxR aktivitását gátolni képes drogok képesek lehetnek a mitokondriális funkciók helyreállítására, és ezáltal a LAM betegség progressziójának lassítására.

### **A mitokondriumok mint potenciális terápiás célpontok a LAM betegség kezelésében**

Az új szintetikus flavonoid, a Proxison (7-decyl-3-hydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4-chromenone) (Antoxis Ltd, UK) potens antioxidáns, amely képes bejutni a mitokondriumokba. A proxison egyesíti egy, a természetben előforduló flavonoid, a myricetin szerkezeti tulajdonságait egy kulcspozícióban elhelyezett lipofil láncéval. Az így előállított molekula képes megvédeni a membránt a lipid peroxidáció káros hatásaitól. A proxison hatásának vizsgálata céljából mind a LAM sejtvonalakat, mind a kontroll normál bronchiális simaizom sejteket kezeltük a droggal. A mitokondriális aktivitást az RH-123 segítségével és a TrxR aktivitásának mérésével jellemeztük. Mindkét teszt a mitokondriumok funkciójának meghökkenő normalizációját mutatta a LAM sejtekben, míg a proxison nem hatott érzékelhetően a normál kontroll bronchiális simaizom sejtekre. A mitokondriumok morfológiájának gyors normalizálódása volt megfigyelhető a LAM sejtekben, ahol a belső membrán krisztái újra elektron-mikroszkóposan láthatóvá váltak. A morfológiai változásokkal párhuzamosan csökkent a CytoC, NRF1, TFAM és a Cox4 gének expressziója, a VEGF ligandok és receptoraik expressziója pedig egyenesen visszacsökkent a normal szintre. További funkcionális vizsgálatok (*scratch* és migrációs tesztek) azt mutatták, hogy a proxison kezelés csökkentette a LAM sejtek proliferációs és migrációs képességét. A proxison e hatása additív volt a rapamycin kezelés hatásával mind a génexpresszió, mind a sejtmigráció tekintetében.

### *A retinsav receptor mint potenciális terápiás célpont a LAM kezelésében*

Mivel a TaqMan array analízis kimutatta a RAR $\beta$  csökkent expresszióját a LAM sejtekben, feltételeztük, hogy az A vitamin metabolizmusa zavart szenved a betegségben.

Hogy megállapítsuk a RAR $\beta$  csökkent expressziójának okát a LAM sejtekben, a sejteket retinsavval (retinoic acid, RA) kezeltük. A LAM sejtek inkubációja 2  $\mu$ M retinsavval normalizálta a sejtek RAR $\beta$  szintjét 24 órán belül. Mivel a RA normalizálta a RAR $\beta$  expresszióját, más rendellenesség szerepére kezdtünk gyanakodni. A mechanizmus tisztázása céljából a teljes A vitamin metabolizmust vizsgáltuk. A sejtek A vitamin tartalmának két fő forrása van: az állati táplálék retinol és a növényi táplálék  $\beta$ -karotin tartalma. A mintegy 600 ismert növényi karotinoid egyike a lutein. A retinol oxidált formája a retinsav. Az A vitamin mindkét forrásból származó formájának megvannak a saját anyagcsere-útjai a közös nukleáris receptoruk elérésére, és osztoznak néhány metabolikus enzimen.

A RAR $\beta$  dereguláció okának megállapítására qRT-PCR segítségével vizsgáltuk az A vitamin metabolizmus enzimjeinek relatív mennyiségét. Az alkohol dehidrogenáz (ALDH1A1), a  $\beta$ -karotin dehidrogenáz 1 (BCO1) és a  $\beta$ -karotin dehidrogenáz 2 (BCO2) expressziója szignifikánsan csökkent ( $P < 0.05$ ) a LAM sejtvonalakban a normál kontroll simaizomsejtekben megfigyelhetőhöz viszonyítva. Gyakorlatilag a LAM sejtekből hiányzott a BCO2 és az ALDH1. Ugyanakkor a retinol dehidrogenáz expressziója (RDH) szignifikánsan nőtt a LAM sejtekben. Hogy kiderítsük, vajon az A vitamin metabolitjai befolyásolják-e az enzimszinteket, a LAM sejtvonalakat és a kontroll normál simaizom sejteket retinsavval és luteinnel kezeltük. Meg kell említsük, hogy a rapamycin a BCO1 és az RDH1 expresszióját csekély mértékben növelte, viszont nem volt hatással a BCO2 és az ALDH1 expressziójára a LAM sejtekben. Érdekes, hogy amíg a retinsav és a lutein kezelés helyreállította a fent említett enzimek expresszióját a normálhoz közeli szintre, rapamycinnel kombinálva a kezelések az RDH1 expresszió extrém emelkedését és az ALDH1 expresszió komplett megszűnését okozták. A rapamycin, a RA és a lutein egyenként mind növelte az RAR $\beta$  expresszióját a normal szintre vagy a fölé, a rapamycin+lutein kombinációs kezelés az RAR $\beta$  expresszióját ötszörösére növelte a kontroll simaizom sejtekben.

A RA kezelés a LAM sejtek proliferációjára és migrációjára gyakorolt hatásának felmérése céljából *scratch assay*-t alkalmaztunk. A RA és a rapamycin kombinációja csökkent proliferációs és migrációs kapacitást eredményezett a rapamycin monoterápiához képest.

### A WNT signalling deregulációja a LAM betegségben

Mivel a WNT signalling az mTOR út egyik robusztus regulátora, humán WNT jelátvitel *TaqMan array plate*-eket használtunk a különböző WNT jelátviteli utakban szereplő molekulák expressziós szintjének vizsgálatára. Mind a négy LAM sejtvonalat és mindkét normál simaizom sejtvonalat egyedileg teszteltük. A vizsgált 92 génből 43-nak az expressziója deregulált volt a LAM sejtekben. 36 gén expressziója szignifikáns csökkenést mutatott, míg 7 gén expressziója nőtt. Többek között szekretált extracelluláris inhibitorok génjeinek csökkent az expressziójuk, pl. SFRP2, SFRP4 és DKK2. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az SFRP4 gátolja az AMPK jelátviteli utat és a mitokondriális depolarizációt. Továbbá az AKT regulálja az SFRP2-t. Az irodalomból ismert, hogy az SFRP4 elvesztése agresszív tumorok kialakulásához, epitélium-mezenchima tranzícióhoz (EMT), felgyorsult sejtmigrációhoz és a Wnt jelátviteli utak *downstream* molekuláinak deregulációjához vezet, A STAT5 jelátvitelt gátló DKK2 expressziójának csökkenése szintén súlyos következményekkel járhat. A STAT5 proteint egy sor hematopoietikus és nem-hematopoietikus citokin és növekedési factor aktiválja, a STAT5 pedig életfontosságú sejtfunkciókat szabályoz, úgymint a proliferáció, differenciálódás és túlélés. A STAT5 protein fontos fiziológiai szerepét mutatja az a nagy számú primér tumor, melyekben a STAT5 konstitutívan aktív. Ez az állandó, szabályozatlan aktivitás jelentősen hozzájárul a tumorsejtek túléléséhez és a betegség malignus progressziójához. A DKK1, a kanonikus Wnt jelátviteli út másik extracelluláris inhibitora azonban szignifikánsan emelkedett expressziót mutat, és irodalmi adatokból ismert, hogy a DKK1 elősegíti májtumor sejtek migrációját és invázióját. Teszi ezt azért, hogy a kanonikus Wnt aktivációtól a nem-kanonikus Wnt jelátviteli utak aktivációja felé tereli a sejtanyagcserét, és ezáltal megnövekedett gyulladáshoz és az NF- $\kappa$ B út aktivációjához vezet. Nemrég ismerték fel, hogy a DKK1 fontos szerepet játszik az artériák falának patofiziológiájában. A Wnt5b egy a Wnt jelátviteli út 19 ligandja közül. Emelkedett expressziója aktiválja a PPAR $\gamma$ -t és indukálja az adipogenezist és a csőformálódást a Snail és a Slug proteinek aktivációja által. A Wnt5b szintén képes a mitokondriális aktivitás modulálására az MCL1-en keresztül, és ismert, hogy elősegíti a sejtek motilitását és többféle tumor metasztázizálását. Az intracelluláris kanonikus Wnt jelátvitel mediator GSK3 $\beta$  expressziója, amely egyben az mTOR út fontos regulátora is, szintén nőtt. A GSK3 $\beta$  expressziójának növekedése ugyanakkor kevésbé informatív, ugyanis az enzim aktivitása erősen függ foszforiláltságának szintjétől.

A GSK3 $\beta$  deregulált aktivitását megfigyelték sok human betegségben, pl. rák és nem inzulinfüggő diabetes mellitus (NIDDM). A GSK3 $\beta$  foszforilációja csökkenti aktivitását, amely a  $\beta$ -katenin akkumulációjához vezet a citoszolban. Az akkumulált  $\beta$ -katenin molekulák aztán a sejtmagba vándorolnak, ahol növelik a kanonikus Wnt függő gének expresszióját. A GSK3 $\beta$  AKT és mTOR általi szuppressziója eltolja a Wnt aktivitást a nem-kanonikus utak irányába, amely hozzájárul a tumoros megbetegedések progressziójához. Ráadásul a RHOA (különböző celluláris folyamatokban részt vevő molekula) expressziója is nőtt. *In vitro* kísérletekben a RHOA onkogén aktivitást mutatott és elősegítette a tumorsejtek invazivitását. Emelkedett expressziója és aktivitása korrelál a karcinogenezis mértékével különböző tumorerőszakok esetén.

## KONKLÚZIÓK

A LAM ritka betegség, ezért kevés figyelmet kap. Noha újabban kifejlesztésre került a betegség néhány állatkísérletes modellje, humán modellrendszerekre lenne szükség a LAM molekuláris patomechanizmusának tisztázásához és új terápiás célpontok azonosításához. Az itt ismertetett munka során molekuláris biológiai megközelítések sokaságát alkalmaztuk a LAM betegekben származó sejtvonalak vizsgálata során.

Vizsgálataink arra az eredményre vezettek, hogy a TSC mutáció és az mTOR út deregulációja csak részben ad magyarázatot a simaizomsejt-szerű LAM sejtek kontrollálatlan proliferációjára. Mitokondriális diszfunkció, deregulált A vitamin metabolizmus és megváltozott Wnt jelátvitel szintén szerepet játszhat a LAM patogenezisében.

A mitokondriumokat komplex molekuláris mechanizmusok szabályozzák. További mutációk azonosítása adhat választ arra a kérdésre, hogy a TSC mutáció önmagában vezethet-e mitokondriális deregulációhoz és hibás metabolikus funkcióhoz. Az a tény azonban, hogy a LAM esetek mintegy 15%-ában nincs TSC mutáció, arra utal, hogy egyéb, talán mitokondriális vagy Wnt jelátviteli gének mutációja is szerepet játszhat a tünetek kialakulásában. Kutatásaink számos deregulált molekulát azonosítottak, pl. a nukleáris ösztrogén receptort, transzkripciós koaktivátorokat mint a PPARGC1 $\alpha$  és a PPARGC1 $\beta$ , amelyek, a peroxiszóma proliferátor-aktiváló receptor (PPAR) génekkel, ösztrogén-szerű receptor (ERR) génekkel és az NRF-1 génnel karöltve képesek az energia-metabolizmus koordinálására. A fentebb felsorolt gének megváltozott expressziója nyomatékosan felhívja a figyelmet, hogy a mitokondriumok szerepének vizsgálata igen fontos a LAM patogenezisének kutatásában. Tovább komplikálja a helyzetet, hogy az A vitamin metabolizmusát szabályozó gének és a Wnt jelátviteli út génjei is dereguláltak LAM-ban. Ez viszont felvillantja a lehetőséget új terápiás célpontok azonosítására.

Eredményeink arra utalnak, hogy a mitokondriális aktivitás helyreállítása igen ígéretes lehetőség a LAM terápiájában. Az erre utaló eredmények egy pre-klinikai fázisban levő gyógyszerjelölt molekula, a proxison teszteléséből születtek. A proxison agyon erős antioxidáns, valamint képes az elektron-transzport láncot és a membrán-potenciált

normalizálni, aféle “csodagyógyszer”-ként viselkedve a mitokondriális diszfunkció helyreállításában. Sok flavonoid – pl. myricetin és quercetin – ismert antioxidáns és képes hatni a mitokondriumokra, azonban a proxison speciális szerkezete erősíti antioxidáns hatását, ezáltal erősebben hat a mitokondriumokra.

Beváltva a hozzá fűzött reményeket, a proxison helyreállította a mitokondriumok aktivitását, normalizálta a deregulált gének expresszióját, és nem mutatott citotoxicitást. A proxison erőteljesebben hatott a sejtekre mint a rapamycin, amely a LAM kezelésére használt elfogadott gyógyszer a klinikai gyakorlatban.

A betegekből izolált sejtvonalak molekuláris térképezése további, mTOR-ral összefüggő jelátviteli utak deregulációját is a felszínre hozta. Korábbi munkákból ismert, hogy a RAR és az ösztrogén hatása egymással ellentétes, sőt az *estrogen response element* (ERE) és a *retinoic acid response element* (RARE) ko-lokalizálódik a genomban és közös célgének expresszióját szabályozzák. Felvetődött, hogy az ER és a RAR vetélkedik a transzkripció aktivitásért, vagy gátolják egymást függően attól, hogy milyen mennyiségben és arányban vannak jelen ligandjaik. Mivel az ERRG szintén képes kötődni az ERE-hez, transzkripció aktivitásának növekedése csökkentheti a RAR-ok expresszióját. A RA vetélkedik az ösztrogénnel a proliferáció gátlása/serkentése terén. Az RA egy antitumor ágens, amelynek ismert anti-proliferatív, pro-apoptotikus és anti metasztatikus hatása. A LAM sejtvonalak kezelése retinsavval helyreállította a RAR $\beta$  normál szintjét 24 órán belül. Az RA nemcsak normalizálta a RAR $\beta$  mRNS-ének expresszióját, hanem csökkentette a LAM sejtek proliferációját és migrációját. Az RA+Rapamicin kombinációs kezelés váratlan hatásaként az A vitamin metabolizmus enzimeit deregulálódottak.

Az evolúciósan konzervált Wnt jelátviteli út molekuláris térképezése szintén segített azonosítani néhány potenciális terápiás célpontot. A kanonikus Wnt jelátviteli út inhibitorainak (DKK1, DKK2, SFRP2, SFRP4) de-regulációja összefügg az agresszív karcinogenezissel, és jelenleg ezek a gének terápiás célpontokká váltak nemcsak daganatos megbetegedésekben, de más, gyulladással és vaszkularizációval járó kórképekben is. A megnövekedett expressziójú ligand Wnt5a és a GSK3 $\beta$  jelátviteli molekula szintén részt vesz az mTOR jelátvitelben, de még sok munkára van szükség pontos szerepük tisztázására a LAM keletkezésében és progressziójában.

A különböző jelátviteli utak komponensei, különösen a mitokondriális diszfunkcióban

fontosak, melyekre munkánk fényt derített, mind fontos potenciális terápiás célpontok lehetnek a LAM kezelésében. A proxison és a retinsav (RA) hatásai különösen ígéretesek lehetnek a mitokondriális funkció helyreállításában, illetőleg a kontrollálatlan proliferáció megállításában. Proxison és/vagy retinsavat adva a betegeknek rapamycin mellett csökkentheti a rapamycin dózist, ezáltal csökkentve annak mellékhatásait.

## **EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA**

Kutatásaink a LAM betegség molekuláris hátterének megismerését célozták. A vizsgálatok különböző nukleáris receptorok, vaszkularizációban involvált molekulák és ezek miRNS regulátorai de-regulációjának felderítéséhez vezettek. Ezen eredmények együttesen a mitokondriumok diszfunkciójának szerepére mutatnak a LAM betegségben.

A mitokondriumok alapos tanulmányozása a SeaHorse és Oroboros platformok valamint electron-mikroszkóp segítségével megerősítette a mitokondriumok diszfunkcióját LAM sejtekben.

A proxison, egy pre-klinikai fázisban levő gyógyszerjelölt molekula, mely egy igen potens antioxidáns, normalizálta a mitokondriumok aktivitását és helyreállította a de-regulált gének expresszióját, implikálva ezzel, hogy a mitokondriumok potenciális új célpontok lehetnek a LAM terápiájában.

Molekuláris térképezés rávilágított a retinsav-receptorok de-regulációjára. A RAR $\beta$  célpontja mind az ösztrogénnek, mind a retinsavnak, és szabályozza a sejtek proliferációját. Retinsav-kezelés normalizálta az RAR $\beta$  mRNS szintjét és csökkentette a LAM sejtek proliferációs rátáját. Az adatok szintén rámutattak az A vitamin metabolizmusra mint további potenciális terápiás célpontra LAM-ban.

Végül, a Wnt jelátviteli utak is de-reguláltak a LAM-ban. További jelátviteli molekulák azonosítása tovább növelheti a rendelkezésre álló terápiás célpontokat, további reményt adva a LAM betegségben szenvedőknek.



## **PUBLIKÁCIÓS LISTA**

**Teljes impakt faktor:** 14.541

### **A tézis az alábbi publikációk eredményein alapszik:**

*Publikált közlemények:*

**Abdelwahab EMM**, Pal S, Kvell K, Sarosi, V, Bai, P, Rue, R, Krymskaya, V, McPhail, D, Porter, A, Pongracz, JE: Mitochondrial dysfunction is a key determinant of the rare disease lymphangioliomyomatosis and provides a novel therapeutic target. *Oncogene* 2018;1. doi:10.1038/s41388-018-0625-1 (IF: 6.854)

*Készülő kéziratok:*

**Abdelwahab EMM**, Bovari-Biri, J, Sarosi, V, Fillinger, J, Harko, T, Moldvay, J, Krymskaya, V, McPhail, D, Porter, A, Pongracz, JE: Vitamin A metabolites normalize metabolic enzyme expressions and decrease neoplastic characteristics of LAM cells. 2019. *British Journal of Pharmacology*

### **Egyéb publikációk:**

*Publikált közlemények:*

**Abdelwahab, E.M.M.**, Rapp, J., Feller, D., Csongei, V., Pal, S., Bartis, D., et al. (2019). Wnt signaling regulates trans-differentiation of stem cell like type 2 alveolar epithelial cells to type 1 epithelial cells. *Respir. Res.* 20: 204. (IF:3.829)

Pénzes Á, **Abdelwahab EMM**, Rapp J, *et al.* Toxicology studies of primycin-sulphate using a three-dimensional (3D) in vitro human liver aggregate model. *Toxicol Lett* 2017;**281**:44–52. doi:10.1016/J.TOXLET.2017.09.005 (IF: 3.858)

### **Prezentációk:**

**Abdelwahab, Elhousseiny.** Pal, S. Kvell, K. Sarosi, V. Bai, P. Rue, R. Krymskaya, V. McPhail, D. Porter, A. Pongracz, JE. Mitochondrial dysfunction is a key determinant of the rare disease Lymphangioliomyomatosis A MAGYAR TUDÓGYÓGYÁSZ TÁRSASÁG 2018.

**Abdelwahab, Elhousseiny.** Pal, S. Kvell, K. Sarosi, V. Bai, P. Rue, R. Krymskaya, V. McPhail, D. Porter, A. Pongracz, JE. **Mitochondrial dysfunction is a key determinant of the rare disease lymphangiomyomatosis and provides a novel therapeutic target** International Chohnoky symposium 2018.

Poszter:

**Abdelwahab, Elhousseiny.** Pal, S. Kvell, K. Sarosi, V. Bai, P. Rue, R. Krymskaya, V. McPhail, D. Porter, A. Pongracz, JE. **ROLE OF MITOCHONDRIA IN LYMPHANGIOLYOMATOSIS.** Targeting Mitochondria Congress Berlin 2017