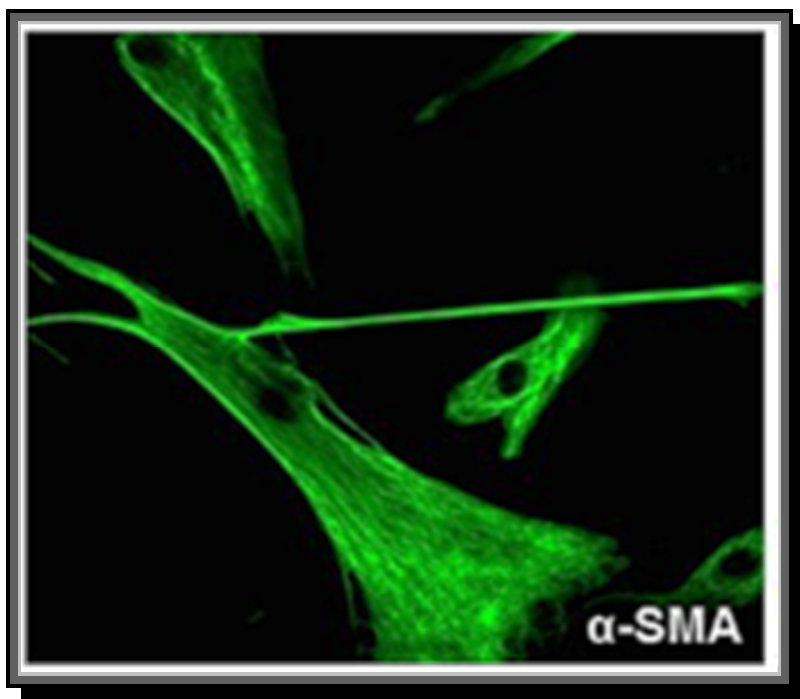


AZ NCX SZEREPE A HUMÁN MIOFIBROBLASZTOK PROLIFERÁCIÓJÁBAN ÉS MIGRÁCIÓJÁBAN



GÁL ELEONÓRA

I.sz. Belgyógyászati Klinika

Pancreas munkacsoport:

Dr. Czepán Mátyás

Dr. Hegyi Péter

Biológia BSC III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatika Kar

2012.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések a dolgozatban	4
Bevezetés	5
<i>Gasztritisz</i>	5
<i>Gyomorrák</i>	5
<i>Miofibroblasztok</i>	6
Célkitűzés	8
Anyagok és módszerek	9
<i>Etikai megfontolások</i>	9
<i>Betegek, izoláció és a HGM sejt kultúra</i>	9
<i>HGM sejtek izolálása, a kultúrák fenntartása</i>	10
Módszerek	10
<i>Immunocitokémia</i>	10
<i>Intracelluláris kalcium-koncentráció mérése</i>	11
<i>RT – PCR</i>	12
<i>Migrációs vizsgálatok</i>	13
<i>Proliferációs vizsgálatok</i>	13
<i>Statisztikai analízis</i>	13

Eredmények	14
<i>Sejtkultúrák immunocitokémiai azonosítása</i>	14
<i>Spontán kalcium oszcilláció HGM sejtek esetében</i>	15
<i>A különböző Ca^{2+} transzport gátlók hatásának vizsgálata a HGM sejtek</i> <i>kalcium szignáljára</i>	17
<i>Az NCX gátlás által bekövetkező sejtmozgás csökkenés</i>	19
<i>NCX blokkolása gátolja a proliferációt</i>	22
<i>NCX mRNS expresszió a HGM sejtekben</i>	23
<i>NCX immunocitokémia vizsgálat</i>	24
<i>NCX immunocitokémia vizsgálat II.</i>	25
Összefoglalás, Konklúzió	26
Nyilatkozat	27
Irodalomjegyzék	28
Köszönetnyilvánítás	31

Rövidítések a dolgozatban

AMV-RT: madár mieloblasztos vírus reverz transzkriptáz

CB-DMB: 5-(N-4-klorobenzol)aminometán

DAG: diacil-glicerol

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: dimetil-szulfoxid

dNTP: deoxiribonukleozid-5-trifoszfát

DTT: ditiotritol

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

EGTA: etilénlikol-tetraacetát

EdU: 5-etilén-2-deoxiuridin

ER: endoplazmatikus retikulum

FITC: fuorescein izotiocianát

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

HGM: humán gyomor eredetű miofibroblaszt

IP3: inozitol 1,4,5-trifoszfát

PBS: foszfát puffer

RPML: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: reverz-transzkriptáz polimeráz reakció

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SEM: standard error of mean, az átlag szórása

SMA: alpha-simaizom aktin

SR: szarkoplazmatikus retikulum

TBE: Tris-Borate-EDTA

TBST: Tris-puffer Saline Tween-20

TEMED: tetrametil-etiléndiamin

TRIS: tris(hidroximetil)aminometán

Bevezetés

A gasztrointesztinális daganatok a nemzetközi és hazai viszonylatban is a rákstatistikák első helyét foglalják el. Magyarországon az összes rákhalálozás egyharmadáért felelősek az emésztőszervi rosszindulatú daganatok, férfiak és nők együttes emésztőszervi rákhalálozása 65%-kal több mint a tüdőráké. Az betegség incidenciája növekszik, a mortalitás stagnál, amely a jó diagnosztikus arzenál mellett, a folyamat korai felismerésének és/vagy kezelésének még mindig nem elég effektív voltára hívja fel a figyelmet.

Gasztritisz

Gyomor falának gyulladásos elváltozása, ami a gyomor nyálkahártyát is érinti. Két formáját különböztetjük meg: akut és krónikus formát. Akut gasztritisz bizonyos ételektől, bakteriális fertőzéstől, nagyfokú stressztől alakulhat ki, de allergiás eredetű is lehet. Krónikus esetben a nyálkahártya sorvad, fennáll a rosszindulatú daganat kialakulásának a veszélye, *Helicobacter pylori* infekció kimutatható a betegek $\frac{3}{4}$ -nél.

Gyomorrák

1 millió beteget érint évente a világon, ebből 700.000 halálessel végződik. Rangsorolásnál a második vezető oka a rákkal kapcsolatos haláleseteknek. A gyomorrák karcinogenezise egy többlépcsős, multifaktoriális, progresszív folyamat. Számos környezeti tényező, mint például a fokozott sóbevitel, epés reflux, N-nitrozo-termékek fogyasztása, antioxidánsok hiánya, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infekció, összefüggést mutatnak a karcinogenezis különböző lépcsőivel. Számos országban, az átlagos populációban összefüggés mutatható ki a *H. pylori* prevalenciája és a gyomorrák mortalitása között, amely arra utal, hogy szoros kapcsolat létezik a *H. pylori* fertőzés és a gyomorrák között. Az International Agency for Research on Cancer (IARC) 1994-ben a *H. pylori* fertőzést elsődleges karcinogénnek nyilvánította. Kicsivel később a World Health Organization (WHO) A-osztályú, evidencián alapuló megfigyelésekre vonatkoztatott rákkeltőnek nyilvánította a *H. pylori*-t (De Wever, O. et al.).

Helicobacter pylori: maga a baktérium és a kórokozócsoporthoz már több mint 100 éve ismert Marshall és Warren kutatómunkája által. A *H. pylori* egy Gram-negatív, microaerophil, ívbén enyhén meghajlott vagy spirálisan csavarodott mozgékony baktérium. Az infekció mind az agresszív faktorokat, mind a mucosát védő, defenzív tényezőket befolyásolja. A baktérium a mucosa felszíni nyálkjában kolonizálódik. Számos enzim termelésére képes, melyek közül az ureáz a pathomechanizmus egyik meghatározó tényezője, amely az ureumból ammóniát és széndioxidot bont, ezzel a savas gyomormilióban a baktérium számára sajátos kedvező mikromilió alakul ki. A felszabaduló ammónia és a baktériumok által termelt citotoxinok lokálisan károsítják az epithelt, illetve a citokinek aktivizációja révén humorális és celluláris immunfolyamatok kezdődnek, amelyek a mucosa akut, majd krónikus gyulladásához vezetnek. Ha a pathogenetikai folyamat az egész gyomormucosára kiterjedt, a krónikus gyulladás atrophia irányába tolódik el, ekkor a sok évtizedes fertőzöttség fennállása után intestinalis metaplasia, -dysplasia, -adenoma szekvencia következményeként gyomorcarcinoma kifejlődése lehet a fertőzés következménye. A krónikus gyulladásos folyamat fenntartásában a gyomorban *H. pylori* infekció esetén a hámsejteken és a baktériumon kívül a submucosalis sejtek is részt vesznek, melyek hetero- és autoaktivációs citokin kaszkádok révén inveterálják a folyamatot (McCaig et al.). Ezen sejtek legfőbb képviselője az aktiválódott fibroblaszt, más néven miofibroblaszt.

Miofibroblasztok

A miofibroblasztok kontraktilis, átmeneti sejtek a fibrociták és a simaizom sejtek között. (1. ábra) A szubepithéliumban lokalizálódnak az egész gasztrointestinalis traktuson keresztül. (Hinz et al. 2007).

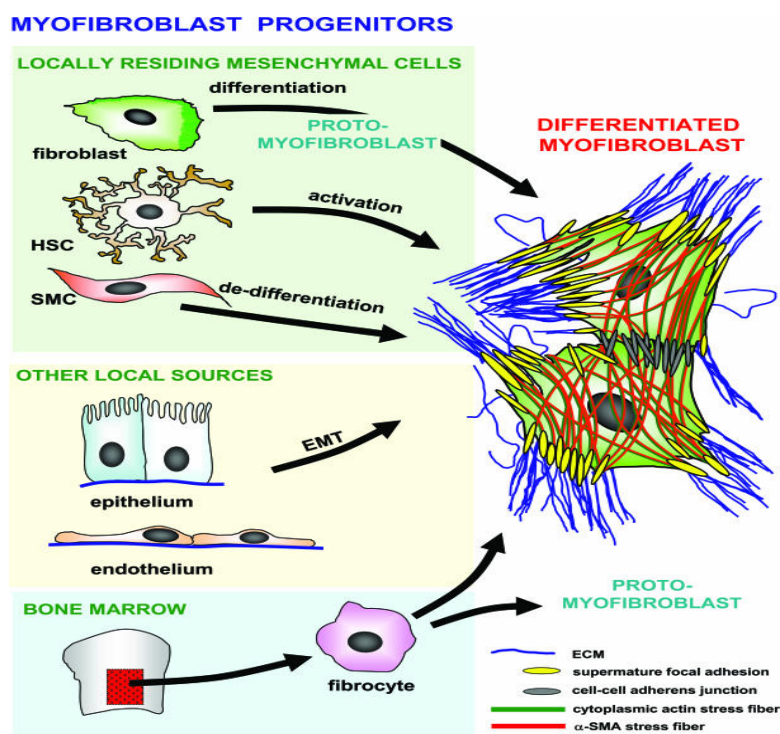
A miofibroblasztokat Gabbiani és munkatársai írták le először az 1970-es évek elején (Gabbiani et al.) Azóta ezek a sejtek a figyelem középpontjában vannak, mert fontos szerepet játszanak az extracelluláris mátrix kialakításában, a morfogenezisben és részt vesznek a gyulladásos folyamatokban is. Ennek során a szöveti regenerációban és az epithél sejtek körüli mikrokörnyezet megváltoztatásában. Elősegítik a *H. pylori* okozta gastritisz kialakulását és az emésztőszervi daganatok megjelenését (krónikus gyulladás-metaplasia-dysplasia-adenoma-karcinoma folyamat). A CAF sejtek (cancer-associated fibroblast), melyek hisztopathológiailag azonosak a miofibroblasztokkal szintén megtalálhatók a malignus daganatokban. Segítik a malignus sejteket az angio-neogenezisben, ezáltal a metasztázis képzésében (Hinz et al. 2010).

Leggyakrabban TGF- β 1 segítségével alakulnak át a szöveti fibroblasztokból. Magas szöveti TGF- β 1 szint esetén, a gyomorrákban szenvedő betegeknél a daganatban előforduló miofibroblasztok számával egyenes arányban csökken a betegek túlélése (Hawinkels et al. 2007). Ezek a sejtek aktívan osztódnak és migrálnak a daganatban, segítik a növekedését, illetve a metasztatikus sejtfejeszkek kialakulásáért is felelősek (Hawinkels et al. 2007).

Az intracelluláris szabad Ca^{2+} szint ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) kiváló eszköz arra, hogy fontos sejtelettani folyamatokat tudjunk tanulmányozni, mint például a sejtmozgás és a sejtosztódás.

Hipotézisünk az, hogy a plazmamembrán fehérje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangernek (NCX) fontos szerepe van a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályozásában, ezáltal a humán gyomor eredetű miofibroblasztok (Human Gastric Myofibroblast, HGM) funkcióinak befolyásolásában. Azonkívül az NCX Ca^{2+} bejuttató funkciója szükséges a des-Arg10-kallidin- és TGF β 1 által stimulált fibriogenezishez és részt vesz a miofibroblaszt fenotípus fenntartásában (Romero et al. 2005).

Az NCX ubiquiter fehérje, melynek három izoformája ismert, és funkciója leginkább foszforiláció által van szabályozva (Quednau et al. 2004).



1.ábra: A miofibroblasztok differenciációja (B. Hinz et al. 2010.)

Át alakulhatnak szöveti fibroblasztokból TGF β 1 segítségével, de származhatnak a csontvelőből is. Malignus folyamatokban kizárólag epithel- és endothel sejtekből alakulnak ki.

Célkitűzés

Ebben a projektben azt tűztük ki célul, hogy feltérképezzük a HGM sejtek kalcium homeosztázisát az NCX-re fókuszálva.

Tanulmányozzuk az NCX és a sejtfunkciók közötti összefüggéseket migrációs és proliferációs vizsgálatok segítségével.

Megvizsgáljuk az NCX mRNS és fehérje expressziót a humán gyomor eredetű miofibroblasztokban.

Megfigyeljük az NCX regulátor faktorként való viselkedését élettani folyamatokban (sejtosztódás, sejtándorlás).

Anyagok és módszerek

Etikai megfontolások

A projekt a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott. Az összes beteg hozzájárulását (informed consent) adta mintáinak (szövet, sejt) kísérletben való felhasználásához.

Betegek, izoláció és a HGM sejt kultúra

A kísérletben felhasznált minták gyomor daganatban szenvedő betegekből származnak, akiket operációval gyógyítottak. A műtéteket a Szegedi Sebészeti Klinikán végezték. A műtét során három-négy centiméterrel a daganat határától szövetmintát távolítottak el a szegélyből. Azonnal a laboratóriumba szállítottak jéghideg médiumban, hogy ezekből sejtenyészetet tudjunk létrehozni (n=3). Két másik szövetmintát kadáver donorokból vettek. (2. ábra)

Beteg kód	Nem	Kor	Diagnózis
T1	Nő	71	Gyomorrák
T2	Férfi	76	Gyomorrák
T3	Férfi	66	Gyomorrák
K4	Nő	42	Szubarachnoideális vérzés
K5	Férfi	49	Traumás fejsérülés

T: Tumoros beteg

K: Kadáver donor

2. ábra: Beteg adatok

A kísérletek során felhasznált minták eredete.

HGM sejtek izolálása, a kultúrák fenntartása

A mintákat többször mostuk, majd 1-2 mm³ darabokra vágtuk fel. Ezután 37^o C-on tizenöt percig rázó vízfürdőbe helyeztük 1 mM dithiothreitol (DTT) hozzáadásával. A mosás után a mintákat 30 percig 37^o C fokon inkubáltuk etilén-diamin-tetra ecetsav (EDTA) hozzáadásával négy egymást követő alkalommal. Majd a sejteket egy-két hétig RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médiumban neveltük, amely 10%-ban borjúsérumot, 1% penicillin-streptomycin és 2% antibiotikus-antimiotikus oldatot tartalmazott. Az RPMI tápoldathoz szükséges alkotóelemek a Sigma-Adrich-tól (USA) származnak. A sejtek konfluenssé vállalása után szélesztettük őket 0,25% tripszin-EDTA oldattal és DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápoldatba kerültek át (Sigma-Adrich, US), amely 4 mM L-glutamint, 10% borjúsérumot, 1% aminosavat, 1% penicillin-streptomycin és 2% antibiotikus-antimiotikus oldatot tartalmazott. A tápoldat minden 48 órában lecseréltük, a sejtek a 10-es passzázs számig lettek felhasználva. A sejtek inkubációja 37^o C fokon történt, 5% CO₂ és 95% levegő összetétel mellett inkubátorban.

Módszerek

Immunocitokémia

Üvegajlú petricsészére 7-10.000 sejtet szélesztünk, és éjszakán keresztül regenerálódni hagyjuk őket. Másnap a sejteket 3,6%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percen keresztül, majd foszfát pufferrel mostuk (PBS) kétszer (Sigma-Adrich, US). A permeabilizációt PBT oldattal végeztük, amely PBS-t, 0,2% Triton X-100-at és 0,3% proteázmentes szérum albumint tartalmazott. A permeabilizáció 30 percen keresztül folyt. Ezután a sejteket PBS-ben feloldott 10% szamar szérummal (Sigma-Adrich, US) inkubáltuk szintén 30 percig. PBS-el kétszeri mosás következett, majd az elsődleges ellenanyag hozzáadása után 4^o C-on éjszakán át inkubáltuk a sejteket.

A következő elsődleges ellenanyagokat használtuk:

1. anti- α -simaizom aktin elsődleges ellenanyag tengerimalacban termeltetve (1:100)
2. anti-vimentin elsődleges ellenanyag egérben termeltetve (1:400)
3. anti-citokeratin elsődleges ellenanyag egérben termeltetve (1:400)
(Dako, Glostrup, Dánia) - mindhárom elsődleges ellenanyag
4. anti NCX1-, NCX2 elsődleges ellenanyag kecskében termeltetve (1:50)
(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US)

A második napon eltávolítottuk az elsődleges ellenanyagokat és a sejteket 0,14 M, 0,5 M, 0,14 M — NaCl oldatokkal mostuk 10 percenként. Ezután a HGM sejteket a másodlagos ellenanyaggal 1 órán keresztül inkubáltuk. Az ellenanyagok hígítási aránya saját eredmények alapján lett beállítva.

Felhasznált másodlagos ellenanyagok:

1. FITC anti-tengerimalac másodlagos ellenanyag (1:400)
2. Texas Red anti-egér másodlagos ellenanyag (1:400)
3. FITC anti-szamar másodlagos ellenanyag (1:400)
(Dako, Glostrup, Dánia) - mindhárom másodlagos ellenanyag

Az inkubáció után a sejteket PBS-sel mostuk, majd utolsó lépésként Vectashield (Sigma-Adrich, US) DAPI-val (Sigma-Adrich, US) történő lefedés következett.

Intracelluláris kalcium-koncentráció mérése

A HGM sejteket (5.000, 30.000, 100.000) fedőlemezre szélesztettük és egy éjszakán át inkubáltuk őket. IFL (inverted fluorescent light) mikroszkóp (Olympus) segítségével történt a sejtek vizsgálata. A sejteket HEPES oldatban 37^o C-on, feltöltöttük Ca²⁺ érzékeny fluoreszcens festékkel (FURA2-AM) egy órán keresztül. Ezután 10 perces mosás következett, amely során beállt egy állandó festékkoncentráció (steady state). Perfúzióban áramoltattuk a különböző oldatokat 6 ml/perc sebességgel a sejtek körül perfúziós kamrában.

Az intracelluláris kalcium-koncentrációban történt változásokat CellR programmal detektáltuk (Olympus). A HGM sejteket 340 nm és 380 nm hullámhosszon gerjesztettük. 340/380 fluoreszcens emissziós rátát (F340/F380) 510 nm hullámhosszon mértük le. A Ca²⁺ mentes oldatokat 1 mM EGTA-val (Sigma-Adrich, US) egészítettük ki. (3. ábra)

mM	HEPES	Na ⁺ -mentes HEPES	Ca ²⁺ -mentes HEPES	Na ⁺ /Ca ²⁺ - mentes HEPES
NaCl	130	0	132	0
KCl	5	5	5	5
Na-HEPES	10	0	10	0
CaCl ₂	1	1	0	0
MgCl ₂	1	1	1	1
Glükóz	10	10	10	10
NMDG	0	140	0	144
HEPES	0	10	0	10

3. ábra: A kísérletekhez felhasznált oldatok összetétele.

RT - PCR

HGM sejtkultúrából izoláltunk RNS-t Qiagen RNEasy Mini Kit segítségével (Qiagen, Crawly, UK) a forgalmazó cég útmutatója alapján. Humán vese RNS-t egészséges sebészeti mintából izoláltunk, TRIzol (Sigma-Adrich, US) reagenst használva. Következő lépésben az RNS-t ártírtuk cDNS-sé. RNS/ primer annealinget 0,5 µg oligo-dT primerrel végeztük 65^o C-on 5 percig. A hűtés után történt meg a reverz transzkripció, amelyhez 30 µl mintát használtunk fel, ami tartalmazza az annealingen átesett RNS/primer, 5X AMV puffert, 1,25 mM dNTP mixet, 20 egység humán RNS-áz inhibitor, 15 egység AMV-RT-t, végül DEPC kezelt vízzel 30 µl-re egészítettük ki az elegyet. A reakció inkubációja 42^o C-on 60 percig tartott. Az enzimek inaktivációja 85^o C-on történt 5 percen keresztül. 1 µl cDNS használtunk templátként minden PCR-hez 25 µl végtérfogatban, amely tartalmazza a master-mixet, 10X Taq-puffert, 10 nM dNTP-t (mintánként), 2.5 egység Taq-polimerázt (mintánként), DEPC-vel kezelt vizet és 1 µM NCX primert.

PCR: denaturáció 95^o C-on 15 s-ig, annellieng 60^o C-on 15 s-ig, polimerizáció 72^o C-on 45 s-ig 30 cikluson keresztül. A PCR termékek és a DNS HyperLadderPlus (BioLine, Taunton, USA) 0,8%-os agaróz gélen futottak, amely 0,005% ethidium-bromidot tartalmazott, Tris-EDTA pufferben 80V feszültségen. A gél előhívását a BioRad UV kamrában végeztük.

Migrációs vizsgálatok

HGM sejteket (125.000 sejt/lyuk) 6 lyukú lemezre szélesztettünk, és egy éjszakán keresztül regenerálódni hagytuk. Másnap a konfluens HGM „monolayer-t” óvatosan megkarcoltuk középen P2 típusú pipetta hegy segítségével. Az egyenes oldalú sebeket használtuk fel a kísérletekhez. Szérummentes tápoldattal mostuk finoman a sejteket háromszor egymás után, majd megvizsgáltuk a sebeket és lefotóztuk őket fázis-kontraszt mikroszkóppal (inverted light microscope). A HGM sejtekhez a reagenseket szérummentes tápoldatban adagoltuk, majd CO₂ inkubátorban inkubáltuk őket 37^o C-on 24 órán át. A migráció kiértékeléséhez leszámoltuk a sejteket a megadott területen 12-24 óra elteltével.

Proliferációs vizsgálatok

HGM sejteket (50.000 sejt) fedőlemezre szélesztettük és egy éjszakán keresztül regenerálódtak. Majd 30 órás széruméheztetéssel szinkronizáltuk őket, ezután 10 µM Click-iT 5-etinil-2-deoxyuridint (EdU) adtunk a sejtekhez (Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Invitrogen, Oregon, US), egy éjszakán át inkubáltuk őket kezeléssel vagy kezelés nélkül. Az inkubáció után a gyártó cég protokollját követve fixáltuk és permeabilizáltuk a sejteket, majd detektáltuk az EdU inkorporációt. A sejtmag jelölésére DAPI festéket használtunk. Az EdU pozitív sejteket általában 10-30 látómezőben 30-szoros nagyításon számoltuk.

Statisztikai analízis

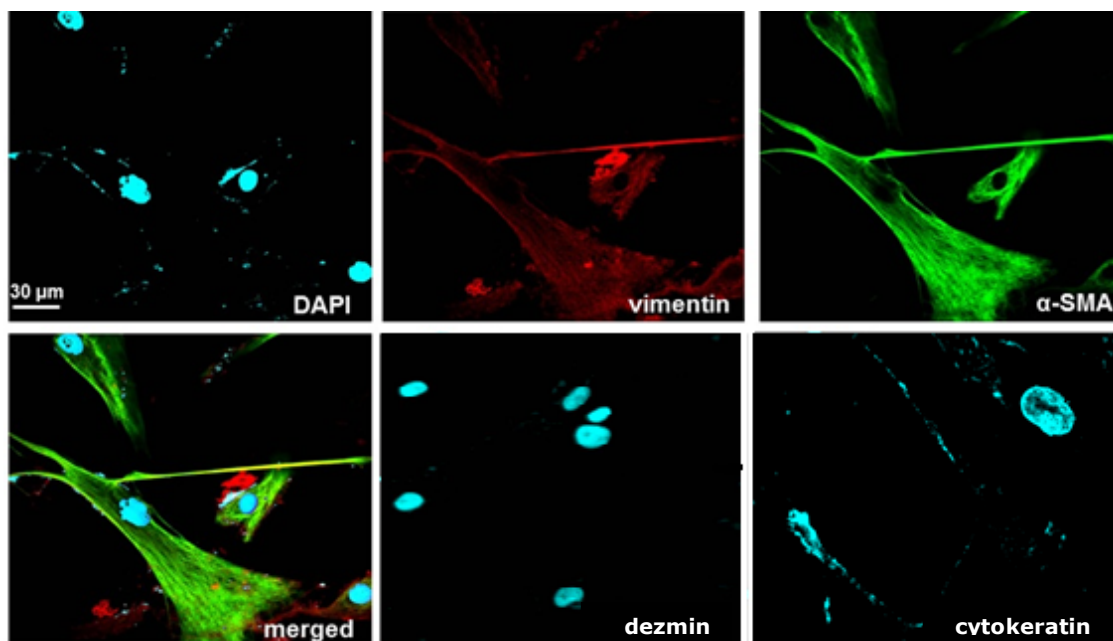
Az adatokat átlag ± átlag szórása (standard error of mean, S. E. M.) formátumban adtuk meg. Statisztikai összehasonlításra a kétmintás próbát, vagy ahol szükséges volt, Bonferroni utótesztel kiegészített Kruskal-Wallis és Wilcoxon tesztet használtunk. $p < 0,05$ értéket vettük szignifikánsnak.

n-szám: betegek száma / független kísérletek száma / független kísérletenkénti sejtszám.

Eredmények

Sejtkultúrák immunocitokémiai azonosítása

A tenyésztett sejteket immunocitokémiai vizsgálatoknak vetettük alá α -SMA és vimentin ellenanyagokat használva, mivel ezek a specifikus markerei a miofibroblasztoknak. Citokeratin és dezmin ellenanyagokat az epithel és izomsejtek detektálására használtuk, miközben DAPI-val a sejtmagokat festettük meg (4. ábra). Vimentin (vörös) és α -SMA (zöld) festődés megerősítette a miofibroblasztok jelenlétét.



4. ábra: Immunocitokémia

Miofibroblaszt sejtek pozitív festődést mutatnak α -SMA(zöld) és vimentin(vörös) ellenanyag esetében, de citokeratin és dezmin ellenanyagok alkalmazása során nem tapasztaltunk festődést.

Sejtmagokat DAPI-val festettük meg.

Spontán kalcium oszcilláció HGM sejtek esetében

FURA2-AM mikrofluorometriás kezelés alatt a sejtek kicsivel több, mint fele spontán kalcium oszcillációt mutatott ($50,38 \pm 4,35\%$). Különböző sejtszámot figyelembe véve újra vizsgáltuk az oszcilláció mértékét, de nem találtunk kapcsolatot a sejtszám és az oszcilláció között. Változatos oszcillációs mintázatot mutattak a különböző sejtek, eltérő amplitúdóval és frekvenciával.

A sejtek 1,5-től 4.0-ig tartó értékben mutattak oszcillációs aktivitást.

(Átlag $1,67 \pm 62$)

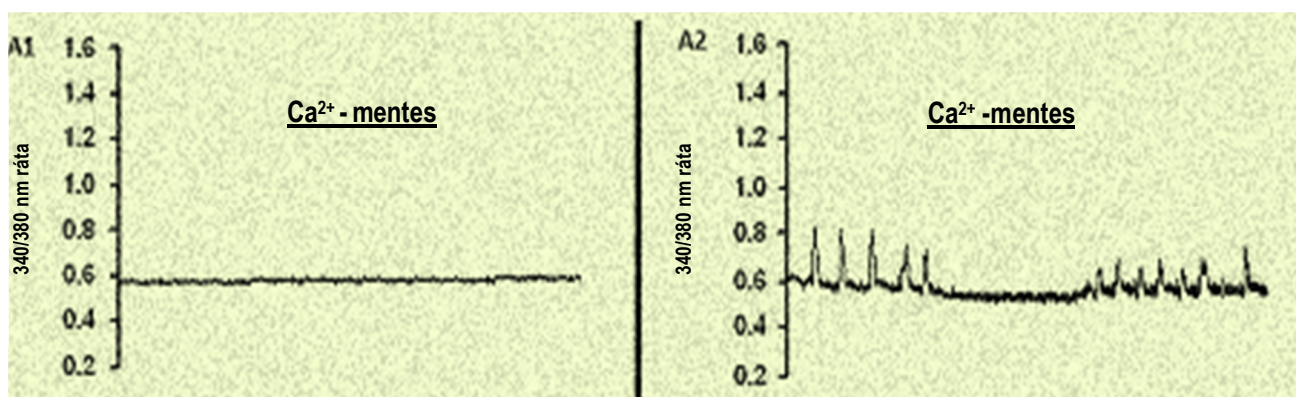
A frekvencia értékek 1,3 / perctől 20 / percig terjedő intervallumba estek.

(Átlag $8,61 \pm 0,772$ / perc)

Az oszcilláció nem volt szinkronban a szomszédos sejtekkel.

Ionmegvonásos-technikát alkalmaztunk az oszcilláló és a nem oszcilláló HGM sejteken.

Az extracelluláris térből való Ca^{2+} megvonás nincs hatással a nem oszcilláló sejtekre, de az oszcilláló sejtek esetében a Ca^{2+} oszcilláció megszűnését figyelhetjük meg. A Ca^{2+} visszajuttatása a rendszerbe az oszcilláció helyreállításához vezet az eredeti mintázat alapján. A kísérletek rámutattak a plazmamembrán kalcium csatorna / transzporter fontosságára (5/A ábra).

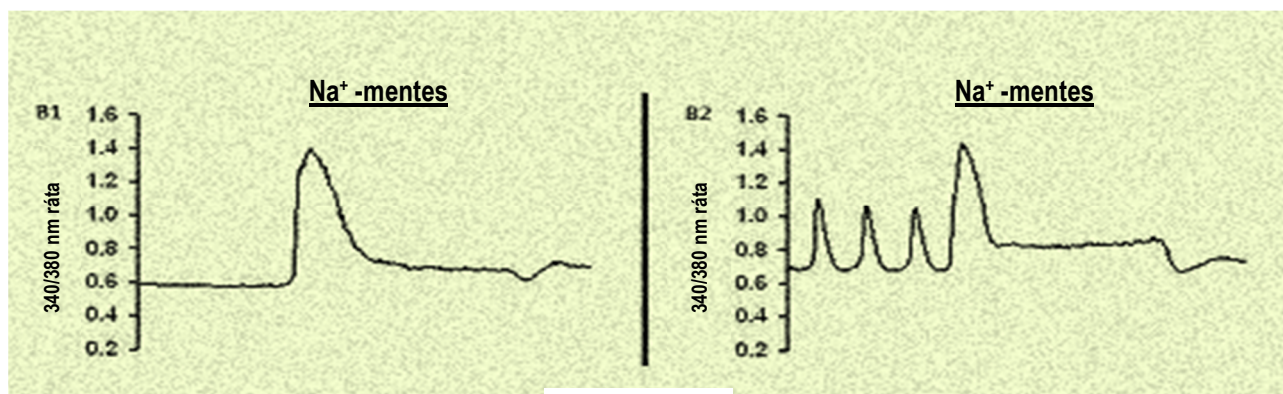


5/A. ábra :

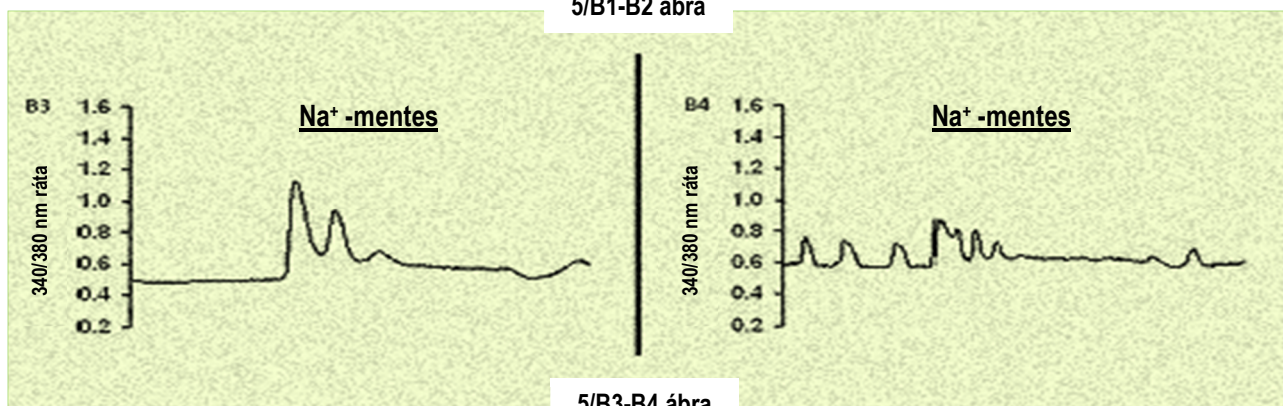
Az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt FURA2-AM fluoreszcens festék segítségével mértük az idő függvényében microfluometriával. Az extracelluláris térben az ionok koncentrációját változtatva regisztráltuk a Ca^{2+} -koncentrációt. A bal oszlopban a nem oszcilláló sejtek találhatók, amíg a jobb oldalon pedig az oszcilláló sejteket figyelhetjük meg.

n=5/6-10/6-10

A Na^+ eltávolítása szintén megállítja az oszcillációt és egy magas amplitúdójú solo kalcium hullámot (5/B1-B2 ábra) vagy kisebb amplitúdójú ismétlődő hullámokat idéz elő mindkét típusban (5/B3-B4 ábra). Ezek a tények vezettek ahhoz, hogy feltételezzük a Na^+ -függő Ca^{2+} transzport folyamatokat HGM sejtekben. Bal oszlopban a nem oszcilláló sejtek, jobb oldalon pedig az oszcilláló sejtek figyelhetők meg.

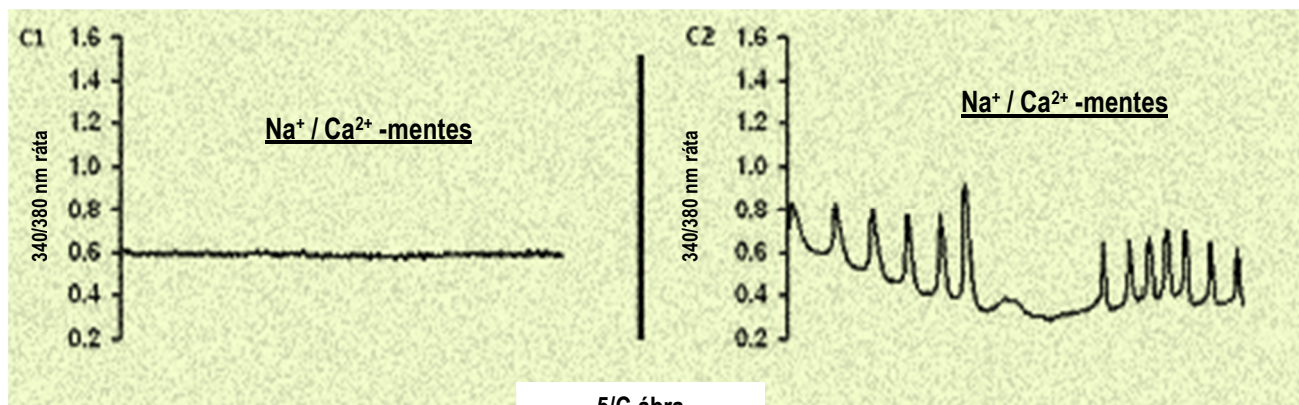


5/B1-B2 ábra



5/B3-B4 ábra

Végül mindkét iont elvontuk a rendszertől, de ez nem okozott változást a nem oszcilláló sejtek esetében, az oszcilláló sejteknél viszont megállította az oszcillációt. Az oszcilláció tökéletesen helyreáll az ionok rendszerhez való visszaadása után. (5/C ábra).

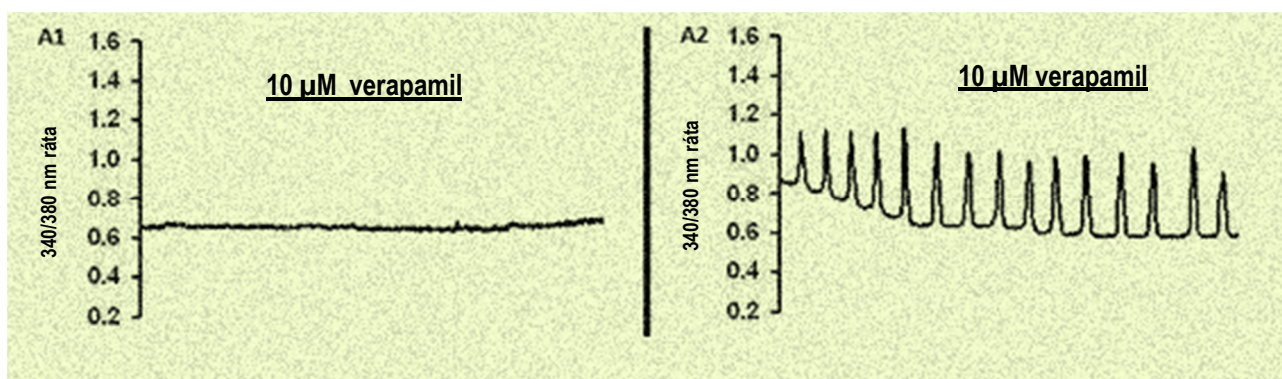


5/C ábra

A különböző Ca^{2+} transzport gátlók hatásának vizsgálata a HGM sejtek kalcium szignáljára

A sejteket HEPES oldattal kezeltük reagensekkel együtt (CB-DMB, verapamil, és NiCl_2) vagy azok nélkül. (6/A. ábra)

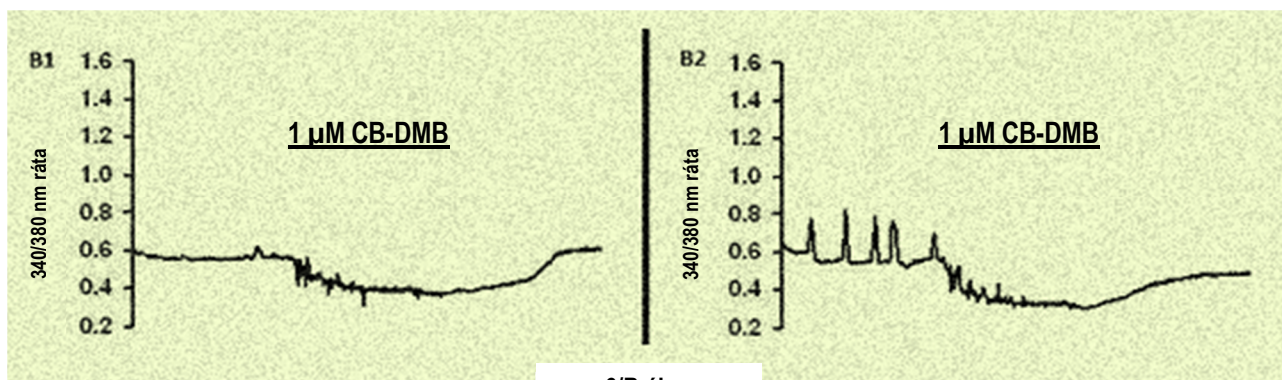
Először a L-típusú kalcium csatorna blokkoló verapamil hatását teszteltük a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra vonatkozóan. Azt tapasztaltuk, hogy 10 μM verapamilnak nem volt hatása a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra.



6/A. ábra

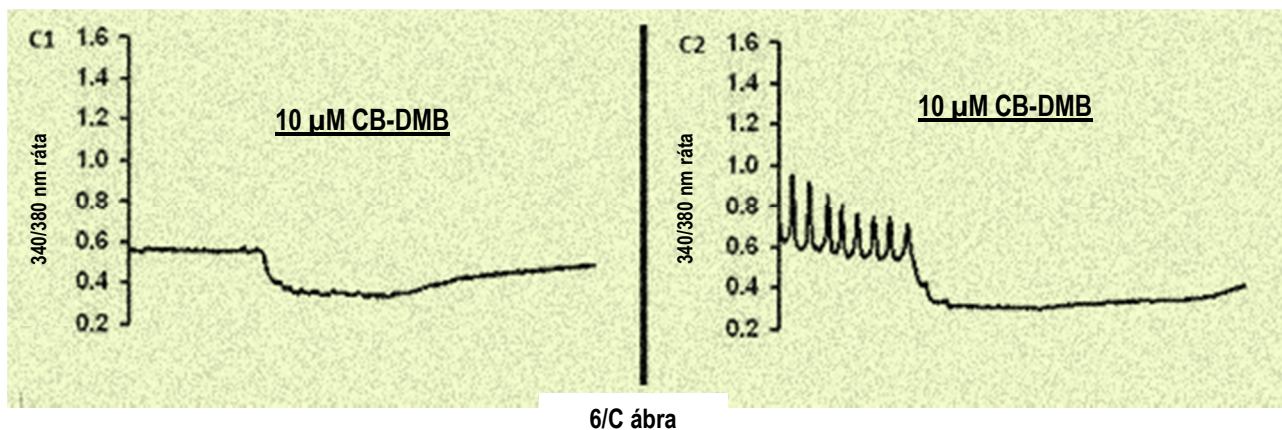
Az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt FURA2-AM fluoreszcens festék segítségével mértük az idő függvényében microfluometriával. Majd az oldatokhoz különböző Ca^{2+} csatorna inhibitorokat adtunk és regisztráltuk a változásokat. Jobb oszlopban a nem oszilláló sejtek láthatók, a bal oldalon pedig az oszillálók. $n=5/4-6/6-1$

Következőleg pán-NCX inhibitort a CB-DMB teszteltük. 1 μM CB-DMB rendszerbe való bejuttatása az intracelluláris Ca^{2+} szint csökkenését okozta. A kezelés megszüntetése után a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ visszaállt, de az oszcilláció nem. (6/B. ábra)



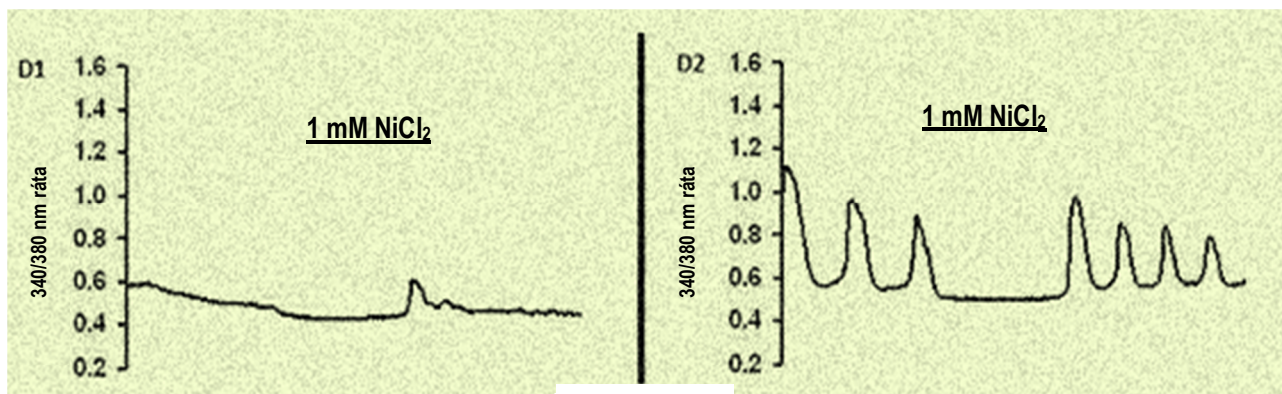
6/B ábra

10 μM CB-DMB jobban csökkentette $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t az oszcilláló sejtek esetében, de a különbség nem statisztikailag szignifikáns (6/C ábra). Az 1 μM vagy a 10 μM koncentrációban alkalmazott szelektív NCX inhibitor CB-DMB alkalmazása során a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenése között sincs szignifikáns különbség.



6/C ábra

Egy másik pán-NCX inhibitor is alkalmaztunk a NiCl_2 -t. 1 mM a NiCl_2 (Salic, A et al.) kismértékben csökkentette a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t egy kicsi túllövéssel a nem oszcilláló sejtek esetén. Oszcilláló sejtek esetében 1 mM NiCl_2 megállította az oszcillációt, de megvonása a rendszertől a normál állapot visszatérését idézte elő (6/D ábra). Ezek a tények bizonyítják, hogy a spontán oszcillációt az NCX tartja fent.

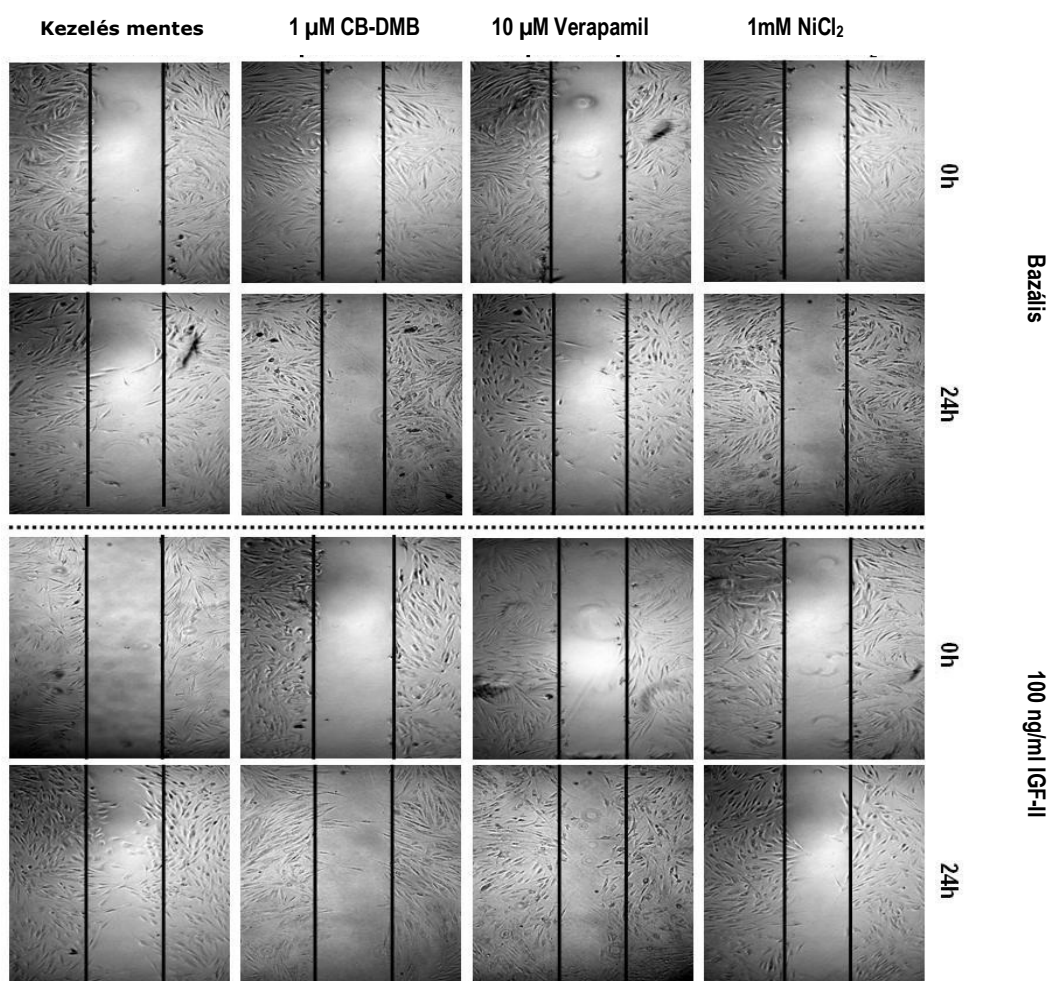


6/D ábra

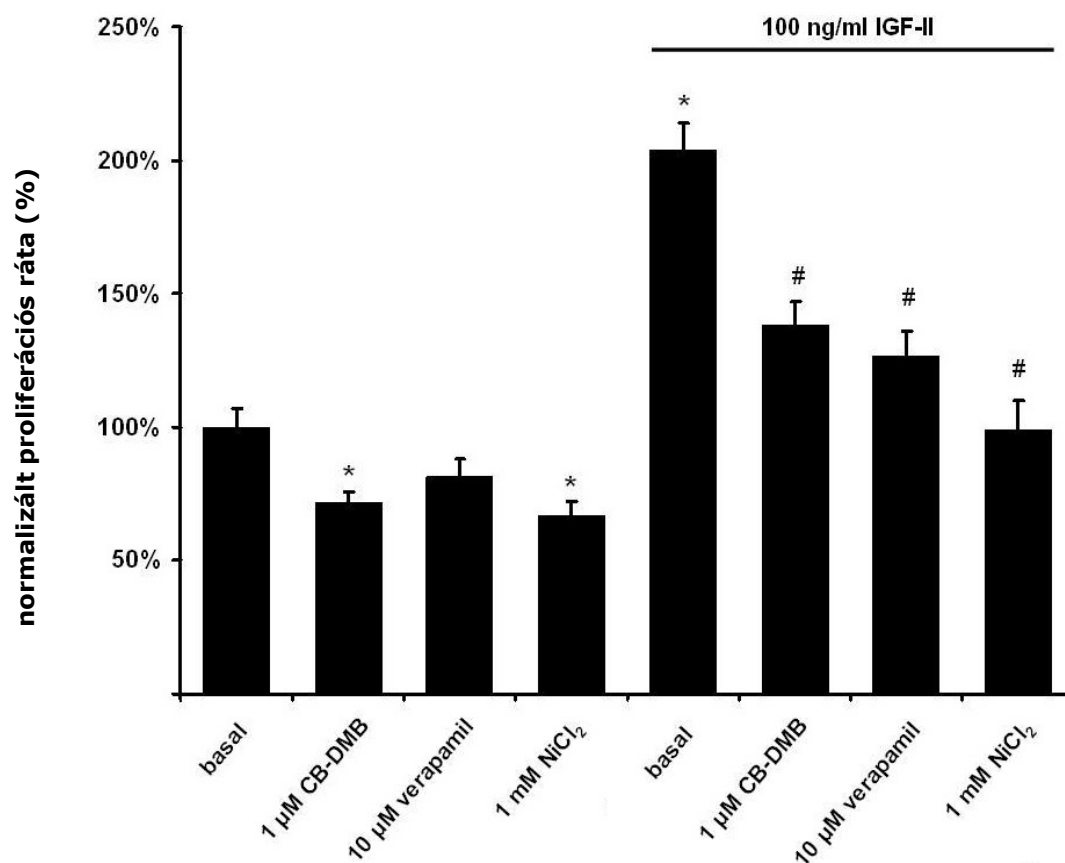
Az NCX gátlás által bekövetkező sejtmozgás csökkenés

Karc-sebzéses migrációs vizsgálatokat végeztünk az előbb használt inhibitorokkal, hogy vizsgáljuk azok hatását a HGM sejtek mozgására. Azt tapasztaltuk, hogy $1\ \mu\text{M}$ CB-DMB és $1\ \text{mM}$ NiCl_2 szignifikánsan csökkenti a mozgást ($28,4 \pm 3,9\%$ és $34,3 \pm 6,6\%$), amíg $10\ \mu\text{M}$ verapamilnak nem volt szignifikáns hatása a migráló sejtekre vonatkozóan (bazális viszonyok). $100\ \text{ng/ml}$ IGF-II-vel történt kezelés kétszeres növekedést idézett elő a sejtmozgásban ($203,9 \pm 9,8\%$ a bazálishoz képest). $1\ \mu\text{M}$ CB-DMB és $10\ \mu\text{M}$ verapamil felhasználása szignifikánsan gátolta a stimulált migrációt ($65,6 \pm 8,4\%$ és $77,3 \pm 9,3\%$), amíg $1\ \text{mM}$ NiCl_2 -os kezelés idézte elő a legerősebb gátlást (7-8. ábra).

Magasabb koncentrációban is akartuk alkalmazni a CB-DMB-t, de a sejtek adherens tulajdonságukat elvesztették $1\ \mu\text{M}$ CB-DMB-nél magasabb koncentráció esetén.



7. ábra: Karc-sebzéses migrációs vizsgálatok eredményei.



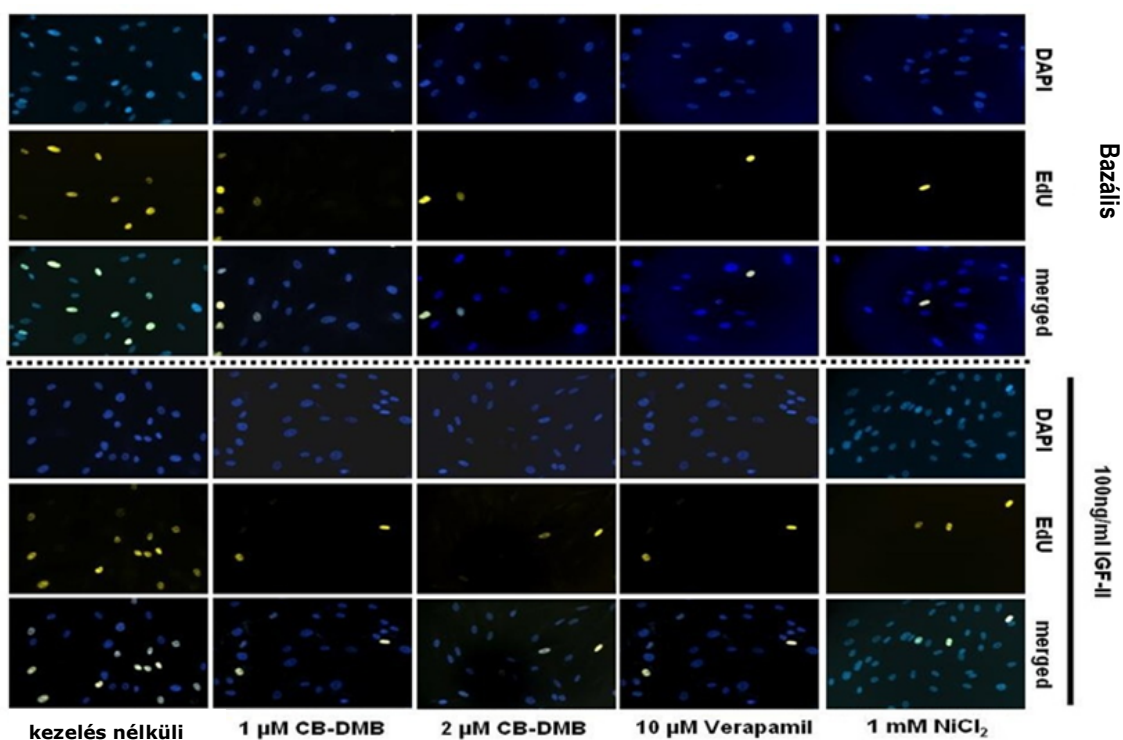
8.ábra: Migrációs assay összesített eredményei.

Kezelés nélküli EdU pozitív sejteket (bazális viszonyok mellett) vettük 100%-nak.

* jelentése, hogy $p < 0,05$ vs. bazális; # jelentése, hogy $p > 0,05$ vs. 100ng/ml IGF-II; $n = 5/4-5/50-300$

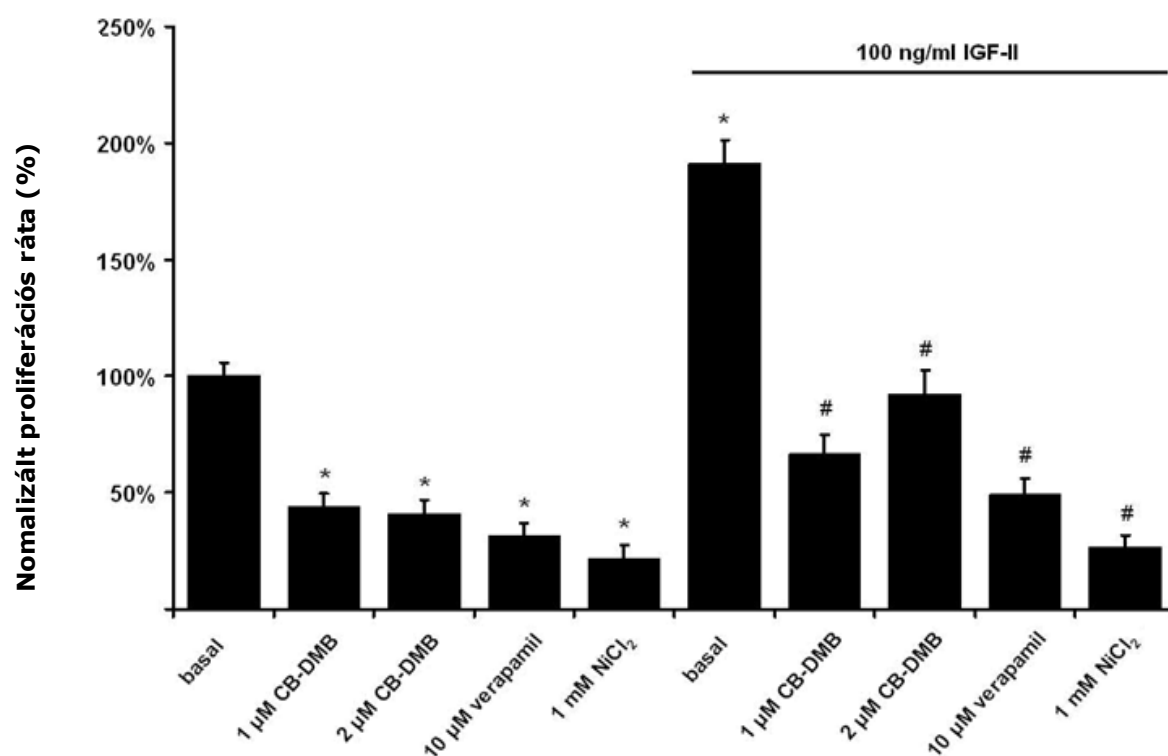
NCX blokkolása gátolja a proliferációt

Ezekkel a vizsgálatokkal azt teszteltük, hogy NCX inhibitoroknak van-e hatása a sejtosztódásra, ehhez EdU inkorporációs vizsgálatokat végeztünk, hogy megállapítsuk a proliferáció mértékét HGM sejtek esetén (9-10. ábra). A sejteket CB-DMB-vel, verapamillal és NiCl_2 -vel kezeltük. 100 ng/ml IGF-II alkalmaztunk, hogy proliferációt stimuláljunk. Azt tapasztaltuk, hogy 1 μM és 2 μM CB - DMB gátolta a sejtosztódást ($55,8 \pm 5,5 \%$ és $59,2 \pm 6,0 \%$); 10 μM verapamil használatakor ($68,3 \pm 4,5\%$) csökkenést detektáltunk. 1 mM NiCl_2 alkalmazása ($78,3 \pm 5,9\%$) csökkenést okozott a sejtek proliferációjában. Ezeket az eredményeket IGF-II stimuláció nélkül detektáltuk. 100 ng/ml IGF-II stimuláció kétszeresére növelte a bazális proliferációs rátát ($191,3 \pm 10,1\%$). 1 μM CB-DMB kiválóan gátolta a sejtosztódást ($124,9 \pm 8,4\%$), 2 μM CB-DMB csaknem azonos hatást fejtett ki, mint az előző mennyiség ($98,8 \pm 9,9\%$ vagy $124,9 \pm 8,4\%$). 10 μM verapamilnak erős gátló hatása volt a proliferációra nézve ($142,0 \pm 6,8\%$), de a legnagyobb gátlást 1 mM NiCl_2 okozta. (Rövid időtartalmú kísérleteink során a NiCl_2 nem mutatta a toxikus fém tulajdonságát.)



9. ábra: Proliferációs assay

EdU inkorporációs vizsgálatokkal tanulmányoztuk a proliferáció mértékét HGM-sejtek esetében



10.ábra: Proliferációs vizsgálatok összesített eredményei

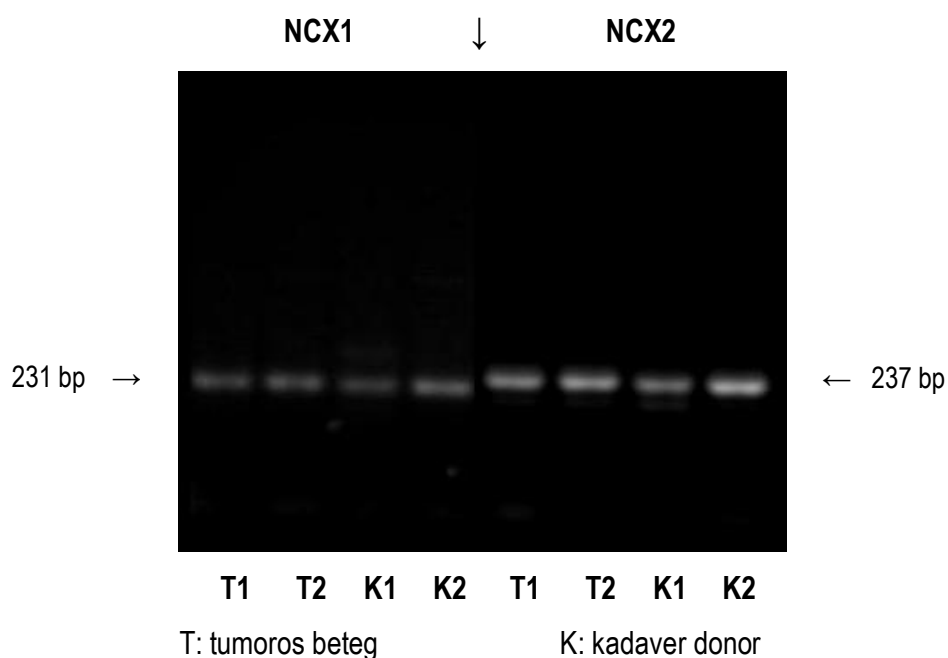
Kezelés nélküli EdU pozitív sejteket (bazális viszonyok mellett) vettük 100%-nak.

* jelentése, hogy $p < 0,05$ vs. bazális; # jelentése, hogy $p > 0,05$ vs. 100ng/ml IGF-II; $n = 5/2-3/1000$

NCX mRNS expresszió a HGM sejtekben

RT-PCR-rel a HGM-sejtekből származó nukleinsav mintákkal NCX1 és NCX2 primereket használva, specifikus primer termékeket kaptunk 231 bp (NCX1) és 237 bp (NCX2) –nál.

A kapott eredmények a vártak megfelelő bázispároknál jelentek meg.

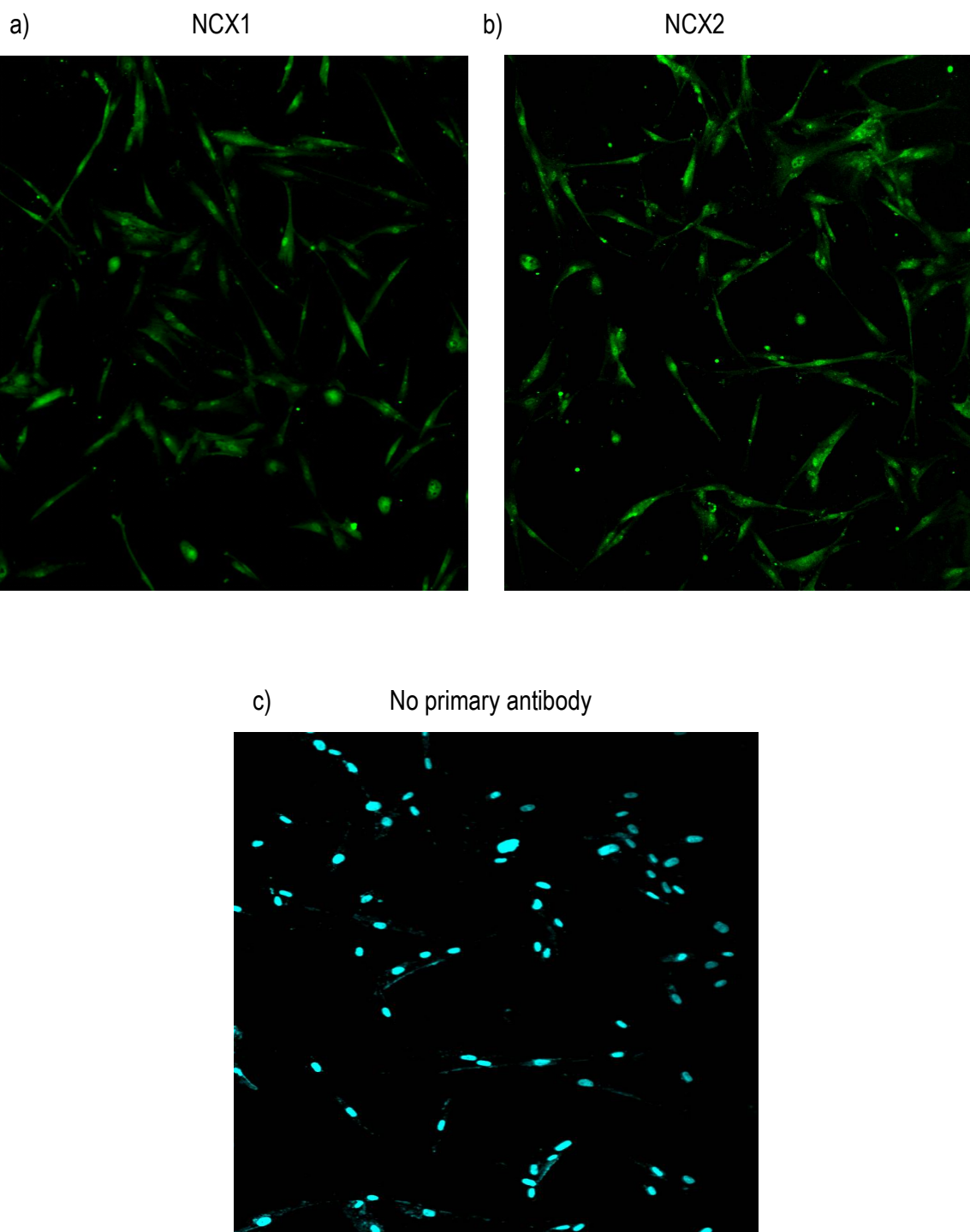


11.ábra: Reverz-transzkripció-PCR eredmények

RT-PCR technikával az NCX1 és NCX2 transzporterek transzkript szintű jelenlétét is igazoltuk.

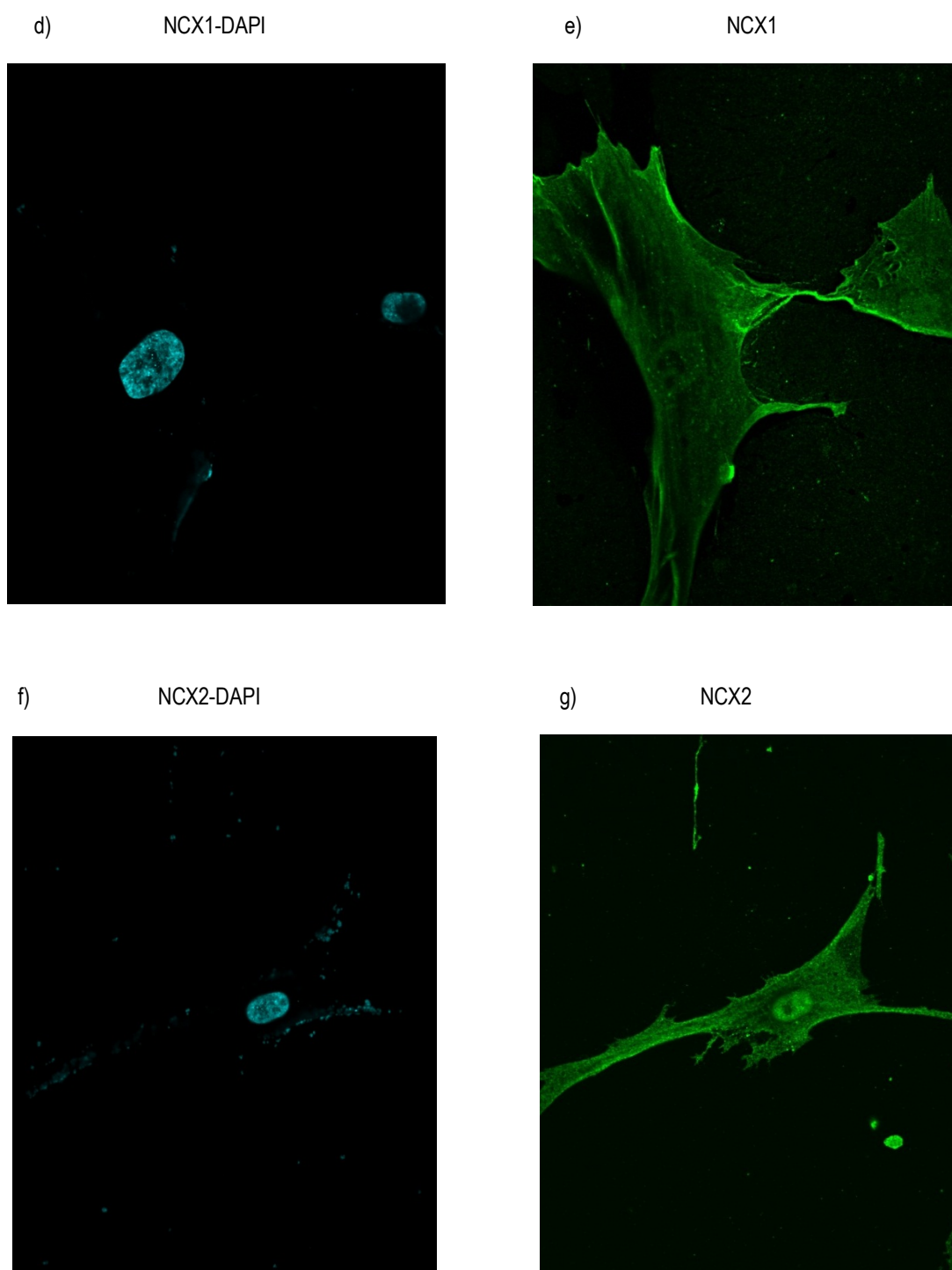
NCX immunocitokémia vizsgálata

A HGM sejtek mind festődtek NCX1 és NCX2 specifikus ellenanyaggal. Specifikus ellenanyag nélkül festődést nem kaptunk.



12.ábra: Immuncitokémiai módszerrel azonosítottuk a sejtekben az NCX1 és NCX2 transzportereket. A sejtmagokat DAPI-val festettük meg.

NCX immunocitokémia vizsgálata II.



13.ábra: A specifikus ellenanyaggal festődött HGM sejtek 60X-os nagyításban.
Sejtmagokat DAPI-val festettük meg.

Összefoglalás, Konklúzió

A humán gyomor eredetű miofibroblasztok funkcionálisan aktív plazmalemmális NCX 1-2 szubtypust tartalmaznak, amely intracelluláris Ca^{2+} oszcillációt generálhat. Ezekeben a sejtekben az NCX és az L-típusú Ca^{2+} csatornák kardinális szerepet játszanak az IGF-II-re adott motilitási és proliferációs válaszban *in vitro*.

A kísérletek során bizonyítottuk, hogy az NCX és az L-típusú kalcium csatornák regulátor szerepet töltenek be a humán gyomor eredetű miofibroblasztokban. NCX1 és L-típusú kalcium csatornák blokkolása hatással van a miofibroblasztok mozgására és proliferációjára. Megfigyeltük, hogy a HGM sejtek spontán kalcium oszcillációt mutatnak. Az ionmegvonásos kísérletek azt bizonyítják, hogy az oszcilláció függ az extracelluláris kalcium és nátrium koncentrációtól, ebből adódóan a plazmamembrán $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ transzporterek fontos szerepét igazolja. L-típusú kalcium csatorna blokkolónak (verapamil) nem volt hatása a kalcium oszcillációra, ebből arra következtetünk, hogy nem a feszültség-függő kation csatornák tartják fent az oszcillációt. Az NCX pán-inhibitor CB-DMB, amely gátolja az NCX forward és reverz működését, megállította az oszcillációt miután kimostuk a sejtekből. NiCl_2 , amely két vegyértékű anion a kalcium számára, az oszcilláció megszűnését okozta abban az idő intervallumban ameddig alkalmaztuk, de a szer kimosása után az oszcilláció visszatér. A plazmamembrán kalcium ATPáz (PMCA) nem vesz részt a kalcium oszcillációban a HGM sejtek esetében (lásd korábbi eredmények).

Hernandez-SanMiguel és munkatársai (2006.) azt bizonyították, hogy a mitokondriális NCX szabályozza a citoszolikus Ca^{2+} oszcillációt HeLa sejtek esetében, de ebben az esetben a sejteket hisztaminin előkezelésnek vetették alá, hogy oszcillációt mutassanak. A mi kísérletünkben viszont azt tapasztaltuk, hogy nem a mitokondriális NCX generálta az sejtek oszcillációját, mert a CB-DMB nem gátolta a mitokondriális NCX működését (Secondo et al. 2009).

A kísérletek azt bizonyítják, hogy az NCX és L-típusú kalcium csatornák szükségesek az IGF-II stimulált migrációhoz és a humán gyomor eredetű miofibroblasztok proliferációjához, amely gyógyszerészeti kutatások alapjaként szolgálhat a jövőben.

Nyilatkozat

Alulírott, **GÁL ELEONÓRA** Biológia szakos hallgató, kijelentem, hogy a szakdolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Szeged, 2012. május 18.

Irodalomjegyzék

- Berridge, M.J., 1995. Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 17(6), p.491-500.
- Bhatt, A. et al., 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 17), p.3415-3425.
- De Wever, O. et al., 2008. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 123(10), p.2229-2238.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G., 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 13(1), p.7-12.
- Downey, G.P. et al., 1990. Actin assembly in electroporated neutrophils: role of intracellular calcium. *The Journal of Cell Biology*, 110(6), p.1975-1982.
- Dreval, V. et al., 2005. The role of Ca^{2+} transport across the plasma membrane for cell migration. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 16(1-3), p.119-126.
- Fresu, M. et al., 2001. Cell-cycle-dependent association of protein phosphatase 1 and focal adhesion kinase. *The Biochemical Journal*, 358(Pt 2), p.407-414.
- Guo, X. et al., 2008. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(28), p.19864-19871.
- Hawinkels, L.J.A.C. et al., 2007. Tissue level, activation and cellular localisation of TGF- β 1 and association with survival in gastric cancer patients. *British Journal of Cancer*, 97(3), k.398-404.
- Hernández-SanMiguel, E. et al., 2006. The mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger plays a key role in the control of cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Cell Calcium*, 40(1), p.53-61.
- Hinz, B., 2010. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics*, 43(1), p.146-155.
- Hinz, B. et al., 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American Journal of Pathology*, 170(6), p.1807-1816.
- Jacob, R., 1991. Calcium oscillations in endothelial cells. *Cell Calcium*, 12(2-3), p.127-134.
- Johnston, L. et al., 2005. Calcium oscillations in interstitial cells of the rabbit urethra. *The Journal of Physiology*, 565(Pt 2), p.449-461.
- Kountakis, S.E. et al., 2000. Effect of verapamil on cholesteatoma migration in vitro. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 122(1), p.91-95.

- Lohr, C., Heil, J.E. & Deitmer, J.W., 2005. Blockage of voltage-gated calcium signaling impairs migration of glial cells in vivo. *Glia*, 50(3), p.198-211.
- Martinez, L.L., Aparecida De Oliveira, M. & Fortes, Z.B., 1999. Influence of verapamil and diclofenac on leukocyte migration in rats. *Hypertension*, 34(4 Pt 2), p.997-1001.
- McCaig, C. et al., 2006. The role of matrix metalloproteinase-7 in redefining the gastric microenvironment in response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 130(6), p.1754-1763.
- Mutoh, H. et al., 2010. Monocyte chemoattractant protein-1 is generated via TGF-beta by myofibroblasts in gastric intestinal metaplasia and carcinoma without *H. pylori* infection. *Cancer Science*, 101(8), p.1783-1789.
- Noble, A. et al., 2003. Insulin-like growth factor-II bound to vitronectin enhances MCF-7 breast cancer cell migration. *Endocrinology*, 144(6), p.2417-2424.
- Petley, T. et al., 1999. Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*, 31(2-3), p.70-76.
- Pietrobon, D., Di Virgilio, F. & Pozzan, T., 1990. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 193(3), p.599-622.
- Quante, M. et al., 2011. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2), p.257-272.
- Quednau, B.D., Nicoll, D.A. & Philipson, K.D., 2004. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), p.543-548.
- Rasmussen, H. et al., 1976. Calcium ion as second messenger. *Clinical Endocrinology*, 5 Suppl, p.11S-27S.
- Romero, J.R. et al., 2005. Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity modulates connective tissue growth factor mRNA expression in transforming growth factor beta1- and Des-Arg10-kallidin-stimulated myofibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(15), p.14378-14384.
- Sakamoto, K. et al., 2009. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in migration and contraction of rat cultured tendon fibroblasts. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 22), p.5345-5359.
- Salic, A. & Mitchison, T.J., 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), p.2415-2420.
- Secondo, A. et al., 2009. Molecular pharmacology of the amiloride analog 3-amino-6-chloro-5-[(4-chloro-benzyl)amino]-n-[[[(2,4-dimethylbenzyl)-amino]iminomethyl]-pyrazinecarboxamide (CB-DMB) as a pan inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in stably transfected cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(1), p.212-221.

- Snow, E.T., Xu, L.S. & Kinney, P.L., 1993. Effects of nickel ions on polymerase activity and fidelity during DNA replication in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 88(2-3), p.155-173.
- Tóth-Molnár, E. et al., 2007. New experimental method to study acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(8), p.3746-3755.
- Zhang, S. et al., 2005. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulating cytosolic Ca²⁺ in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 288(2), p.C245-252.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek **DR. CZEPÁN MÁTYÁS** és **DR. HEGYI PÉTER** szakmai irányítását és rengeteg segítségét.

Szegedi Tudományegyetem

I.számú Belgyógyászati Klinika

Prof. Dr. Wittmann Tibor
Prof. Dr. Takács Tamás
Dr. Rakonczay Zoltán Jr.
Prof. Dr. Lonovics János
Schnúr Andrea
Kemény Lajos
Fuksz Zoltánné

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Prof. Dr. Varró András
Dr. Venglovecz Viktória

Sebészeti Klinika

Prof. Dr. Lázár György
Dr. Simonka Zsolt

Pathológiai Intézet

Dr. Tiszlavicz László
Dr. Németh Balázs

University of Liverpool

Department of Physiology

Prof. Dr. Varró Andrea