

Proteoglikánok a májban

Kovalszky Ilona,¹ Dudás József,¹ Gallai Mónika,¹ Hollósi Péter,¹ Tátrai Péter,¹
Tátrai Enikő,¹ Schaff Zsuzsa²

Semmelweis Egyetem ¹I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
²II. sz. Patológiai Intézet, Budapest

A proteoglikánok fehérjevázból és az ahhoz kovalensen kapcsolódó savanyú cukorláncokból épülnek fel. A szervezetben mindenütt jelen vannak, elsősorban az extracelluláris mátrixban és a sejtek felszínén. A májban normális körülmények között elsősorban syndecan-1 található. Májcirrhosisban minden általunk vizsgált proteoglikán mennyisége nő. Májrákban a syndecan-1 mennyiségi változásánál sokkal jellemzőbb a molekula kóros lokalizációja. A tumor jellegzetessége az agrindús stróma. A proteoglikánok részben fehérje-, részben cukorláncok részvételével aktív részesei a sejtműködés szabályozásának. Mennyiségi és minőségi változásuk hozzájárul a daganatos fenotípus kialakításához. A májrakok heparánszulfátjai alulszulfatáltak, és ezért biológiai hatékonyságuk csökken, vagy megváltozik. Kevésbé kötik a transzkripció faktorokat, és nem gátolják a topoisoméráz I aktivitását. A syndecan-1 csonkolt mutánsa a hepatomasejtek differenciációját idézi elő és gátolja az endogén syndecan-1 extracelluláris domén lehasadását (shedding). Ez a jelenség a shedding sejtszabályozásban betöltött szerepére hívja fel a figyelmet. *Magyar Onkológia 48:207-213, 2004*

Proteoglycans are macromolecules formed by a protein core to which sugar chains are covalently attached. They are present on the cell surface and in the ECM of living things. In normal liver syndecan-1 is the dominant transmembrane proteoglycan, trace amounts of ECM proteoglycans are in the stromal components. The amounts of proteoglycans we studied increase in liver cirrhosis. In liver cancer abnormal localization of syndecan-1 and stroma rich in agrin was characteristic. The core proteins as well as the sugar chains of proteoglycans interact with and modulate the effect of regulatory factors. This implies that structural alterations of proteoglycans contribute to the development of malignant phenotype. Heparan sulfate chains of liver cancer are undersulfated with decreased or altered biological activity. Their binding capacity for transcription factor decreases, and they do not inhibit topoisomerase I enzyme. Truncated form of syndecan-1 lacking the extracellular domain of the molecule induces differentiation of hepatoma cell line and inhibits the shedding of syndecan-1. This phenomenon calls attention to the importance of syndecan-1 shedding in the regulation of cell behavior. *Kovalszky I, Dudás J, Gallai M, Hollósi P, Tátrai P, Tátrai E, Schaff Z. Proteoglycans in the liver. Hungarian Oncology 48:207-213, 2004*



Bevezetés

Az elmúlt 19 év jelentős részét azzal töltöttem, hogy megértsem, mi a szerepük a proteoglikánoknak a máj normális és kóros működésében. Ezt az időszakot szorosán átszötte a Jeney Andrásval va-

ló munkakapcsolat. Valamikor nagyon régen Ő volt az, aki azt mondta, talán a glükóزامinoglikánokkal (GAG) kellene foglalkozni. A máj kutatás pedig abban az időben az intézet tudományos tevékenységének meghatározó vonala volt. A kettő összekapcsolódása szinte magától adódott. Én persze akkor még nem tudtam, hogy a GAG-ok a proteoglikánok cukorláncai. Azt sem, mik azok a proteoglikánok. A mentségem az, hogy akkortájt általában nem tudtak sokat a proteoglikánokról. A 80-as évek közepén a rákkutatásban mindenki „onkogénlázban” égett, a DNS, RNS és fehérje mellett ugyan mit számított a cukor. Bennem sem volt túl nagy lelkesedés a GAG-ok iránt. Ami volt, azt jórészt András öntötte belém. Az ő előítéletektől mentes érdeklődése, hite a téma fontosságá-

Közlésre érkezett: 2004. augusztus 30.
Elfogadva: 2002. szeptember 4.

Levelezési cím: Dr. Kovalszky Ilona,
Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti
Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26.,
tel.: 266-1638/4449, e-mail: koval@korb1.sote.hu

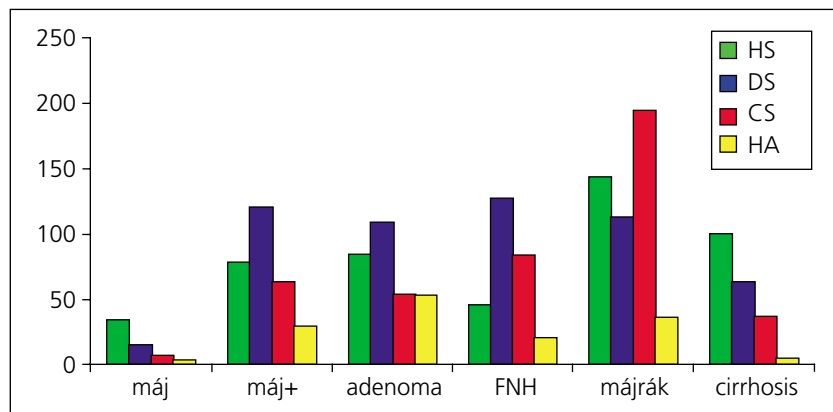
A szerzők a közleményt Dr. Jeney András egyetemi tanár 70. születésnapjára ajánlják.

ban, öröme a kezdeti szerény eredmények láttán adta az erőt ahhoz, hogy átverekedjem magam a kezdeti buktatókon, megtanuljam a módszereket és lépésről lépésre haladjak előre a proteoglikán-kutatás akadályokkal megtűzdelte útján. Az eltelt 20 év öt igazolta. Aki proteoglikánokat kutat, részese a genomikának, proteomikának, és már ott van a glükomika sűrűjében is.

1. táblázat. A proteoglikánok felosztása. A proteoglikánok elsősorban a sejtfelszínen és az extracelluláris mátrixban találhatóak. A sejtfelszíni PG-k közül legismertebb a syndecan és a glypican család, de fontos szerepe van a CD44 különféle splice variánsainak is. A kis leucingazdag proteoglikánok (SLRP) a kötőszövetben találhatóak. Ugyanitt van a versican is. A bazális membránok típusos proteoglikánjai a perlecan és az agrin. Az aggrecan a porc fő proteoglikánja.

Lokalizáció	Típus	Cukorlánc
Intracelluláris	Serglycin	HS/CS
Membrán		
SLIPS (syndecanszerű, transzmembrán proteoglikánok)	syndecan-1 syndecan-2,-3,-4	HS/CS HS
GRIPS (glypican csoportba sorolható sejtfelszíni proteoglikánok)	glypican	HS
részidős PG-k	betaglycan CD44	HS/CS CS
Extracelluláris		
SLRPS (kis, leucinban gazdag proteoglikánok)		
I. csoport	decorin, biglycan	CS/DS
II. csoport	fibromodulin, lumican, keratocan PRELP, osteoadherin	KS KS
III. csoport	epiphycan osteoglycin	CS/DS KS
Moduláris PG-k		
hyalectanok (hyaluronsavat és lektint kötő PG-k)	versican, aggrecan, neurocan, brevican	
hyaluronsavat nem kötő PG-k	perlecan, agrin, testican	HS/CS

1. ábra. Glükózaminoglikánok változása humán májmintákban. Normális körülmények között a májban elsősorban HS található, elenyésző mennyiségben mutatható ki DS és CS. A peritumorális májban, az adenomákban és az FNH-ban a DS mennyisége fokozódik legnagyobb mértékben, de az összes GAG-tartalom is nő. A májrákban legkifejezettebben a CS mennyisége fokozódik. A jó- és rosszindulatú daganatokban egyaránt fokozódik a hyaluronsav-tartalom. A cirrhosisban a HS és DS mennyisége nő.



A proteoglikánokról

A proteoglikánok (PG) típusosan sejtfelszíni és ECM fehérjék (13, 17, 23, 39). Jellegzetességük, hogy vázfehérjékhez savanyú cukorláncok, glükózaminoglikánok (GAG) kapcsolódnak O-glikozidos kötéssel. A GAG-ok hexózámból (N-acetilglükózamin, vagy N-acetil-galaktózamin) és uronsavból (glükuronsav vagy iduronsav) álló diszacharid-alegységekből épülnek fel. Változó mértékben szulfatáltak. A szulfát- és karboxilcsoportok a cukroknak savanyú karaktert kölcsönöznek. Az endoplazmás retikulumban szintetizálódó vázfehérjék szerin-glicin motívumaihoz a cukorláncokat a Golgi részecskében található enzimek kapcsolják. A szerinhez 4 tagból álló cukorlánc kapcsolódik, melynek első tagja minden esetben xilóz, ezt két galaktóz és egy glükózamin molekula követi. Ezt követően a GAG-polimerázok (EXT1-2) végzik a cukorláncok uronsav-glükóz/galaktózamin diszacharid-egységekből felépülő meghosszabbítását. A szulfatálást többféle szulfotranszferáz enzim végzi ugyanitt (NDST, O-szulfotranszferázok). A cukorláncok ráépítése a fehérjére a glikanálás, melynek szabályozása még nem ismert (11). Az általunk vizsgált proteoglikánok heparánszulfát (HS), dermatánszulfát (DS) és kondroitinszulfát (CS) cukorláncokat hordoznak. A szulfatáltsági mintázat alapján acetilált és szulfatált (S domén) egységeket különíthetünk el a GAG láncokon (30). Utóbbiak aktív szerepet játszanak a molekuláris interakciókban. A vázfehérjék szerkezete a 80-as évek végéig alig volt ismert, mert vizsgálatukat a cukorláncok nagymértékben zavarták. Pontosabb tanulmányozásukra a molekuláris biológiai módszerek nyújtottak lehetőséget. Klónozást követően mód nyílt a fehérjék kódoló mRNS-ek, illetve a gének bázissorrendjének meghatározására. Ettől kezdve a PG-k száma és típusa rohamosan szaporodott. Jelenleg a proteoglikánokat (a teljesség igénye nélkül) az 1. táblázatban bemutatottak szerint csoportosíthatjuk. Az elmúlt néhány évben számos fehérjéről derült ki, hogy részidős proteoglikán.

A GAG-ok változása májbetegségekben

Kutatásaim első szakaszában csak GAG-okat vizsgáltam. Ezek a vizsgálatok kísérletes és humán májmintákon arra engedtek következtetni, hogy alig található olyan molekulacsatlád, melynek változásai annyira szembeötlőek a májcirrhosisban és májrákban, mint a GAG-oké (22). Mennyiségük a normális érték sokszorososa lesz, és a GAG-pattern csaknem differenciáldiagnosztikus értékű az ép máj, a daganathordozó máj, a májcirrhosis és májrák között (1. ábra). Az ép májban nagyon kevés a glükózaminoglikán, és ennek nagy része heparánszulfát (HS). A máj nem rákos megbetegedéseiben elsősorban dermatánszulfát (DS) szaporodott fel. Meglepő volt, hogy a GAG-ok összetétele a szövettanilag teljesen épnek tűnő peritumorális májban is megváltozott. A májrákokra a kondroitinszulfát (CS) felszaporodása volt jellemző.

A mennyiségi változások mellett minőségi változások is kialakultak. Ezek közé tartozott a szulfatáció megváltozása. Mind a heparánszulfátok, mind a kondroitinszulfátok diszacharid-alegységeinek szulfatáltsági foka és a szulfátcsoportok helye eltér az ép szövetben találttól. Ez a változás különösen fontos a heparánszulfát esetén, mert a HS lánc szulfatáltsági mintázata befolyásolja a cukorlánc molekuláris kölcsönhatásait. A 2. táblázat 3 peritumorális máj és 2 májrák HS diszacharid-analízisének eredményét mutatja be. Jól látható, hogy a peritumorális májhoz képest elsősorban a HS 6-O-szulfatáltsága csökkent.

A tumorban mért értékek azonban nem tértek el drámaian a környezetben mérttől. Ez csalódást jelentett, mert a patkánymáj HS-ről azt írták le, hogy magasan szulfatált, heparinszerű (27, 28), a daganatos HS-ek pedig az általánosan elfogadott nézet szerint mindig alulszulfatáltak (24, 31, 32, 44). Mivel magyarázhatjuk humán mintákban a csekély különbséget? Az egyik lehetőség az, hogy a humán májban normális körülmények között sem olyan magas a HS-ek szulfatációja, mint a patkánymájban. A másik magyarázathoz csak az elmúlt évben sikerült kísérleti adathoz jutnunk. Kiderült, hogy a májrákokban viszonylag nagy mennyiségben van szabad, vázfehérjéhez nem kötött HS, melyet éppen vízdékonysága miatt korábban az első tisztítási lépésnél elvesztettünk. Ez a HS-frakció valóban kifejezetten alulszulfatált, szemben az ép máj azonos frakciójával (2. ábra).

A tumoros HS-láncok átlagos mérete nagyobb, mint a peritumorális májból kinyerteké. A lokalizáció is kóros lehet. A májban a heparánszulfát főleg a sejtek felszínén és az ECM-ben található. Kóros állapotban, de elsősorban májrákokban a HS megfigyelhető a sejtmagban is (3. ábra).

A proteoglikánok változásai májcirrhosisban és májrákban

A GAG-ok döntő hányada fehérjéhez kötve van jelen a szervezetben, tehát a cukrok mennyiségi és minőségi eltéréseinek háttérében meghatározott proteoglikánok változásai húzódnak meg. Az általunk megfigyelt jellegzetességeket a 3. táblázat mutatja be.

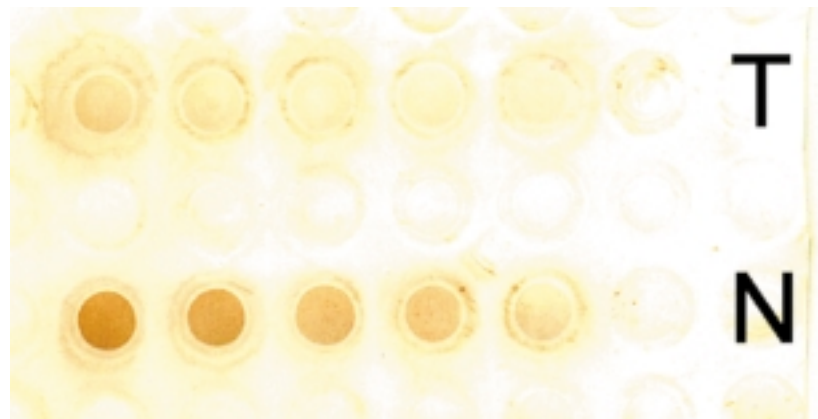
Az ép májban a legnagyobb mennyiségben a transzmembrán syndecan-1 található, a hepatociták bazolaterális felszínén és az epeutak hámsejtjein. Jóllehet a syndecan-2 mRNS-e nagy tömegben mutatható ki a májban, a fehérje mennyisége csekély. Csak az erek és epeutak falában van agrin és perlecan, a portális háromszögben és a vena centralisok körül kevés decorin.

A máj károsodására a proteoglikánok mennyisége igen gyorsan változik. A gyulladás fokozza a kötőszöveti proteoglikánok termelését. A decorin, melyet a kötőszöveti sejtek termelnek, szinte előre jelzi a kollagén lerakódásának a helyét. A gyulladás előrehaladtával, a fibroticus és cirrhoticus májban nagyon sok decorin halmozódik fel a kötőszövetes sövényekben és a kapillarizáló

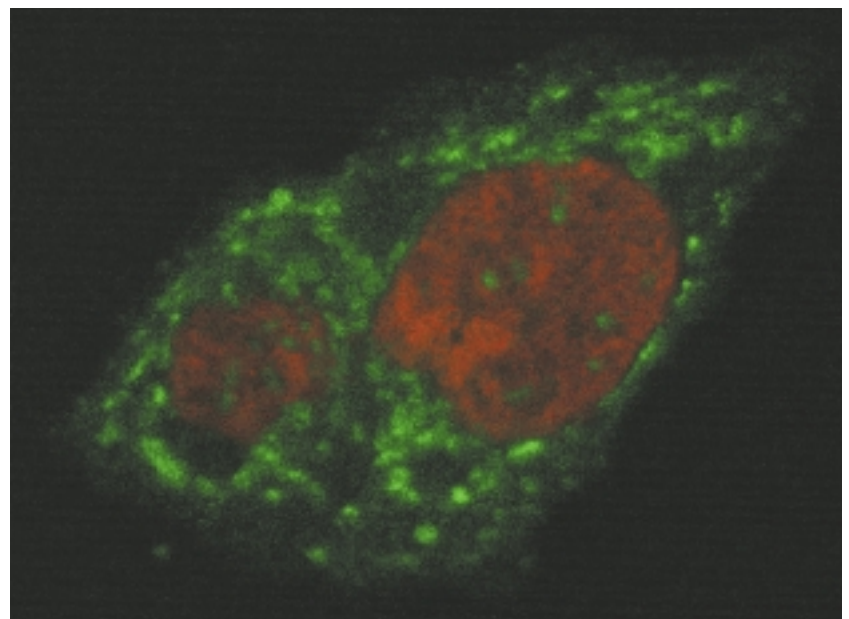
2. táblázat. A májrák és a peritumorális máj fehérjéhez kötött HS-éből heparitináz emésztést követően nyert diszacharidok szulfatáltsági mintázata. Az 1., 3., 5. oszlop peritumorális májak értékeit, a 2., 4. oszlop a májrákokét mutatja. Látható, hogy eltérés elsősorban a 6-O-szulfatáltságra mutatható ki. Az 1-2. és 3-4. minták két tumor-környező szövet párból származnak.

Minta:	1	2	3	4	5
N-szulfatált	39,2	36,7	32,4	30	39,6
2-O-szulfatált glükózamin-tartalmú (2S)	13,8	13,6	14,1	13,8	13,4
6-O-szulfatált glükózamin-tartalmú (6S)	22,2	13,1	14,9	12,6	23
2S + 6S (összes O-szulfatált)	36	26,7	29	26,4	36,4
összes szulfatált	75,2	63,4	61,4	56,4	76

2. ábra. A májban és a májrákban egyaránt kimutatható szabad, vázfehérjéhez kötött heparánszulfát. Ennek mennyisége mintegy 10x több a májrákban, viszont a magasan szulfatált epitópot felismerő ellenanyag ezzel a HS-sel nem reagál. Az ábrán azonos mennyiségben, sorozathígítással nitrocellulózhoz fixált májrák- és máj eredetű HS immunreakciója látható a HS4C3 GlcNS3S6S-IdoUA2S (erősen szulfatált) ellenanyaggal.



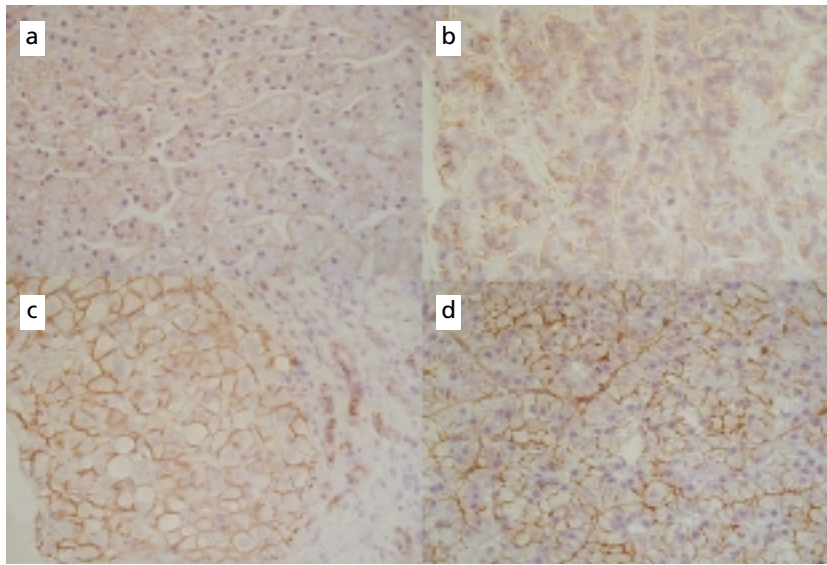
3. ábra. Biotinnal jelölt máj HS HepG2 sejtekben. A sejteket 10 mg/ml koncentrációban inkubáltuk HS-sel, melyet ép májból izoláltunk. A magi pozitivitás kb. 4 óra elteltével jelenik meg. A kimutatás streptavidin-FITC-el történt, konfokális mikroszkópon.



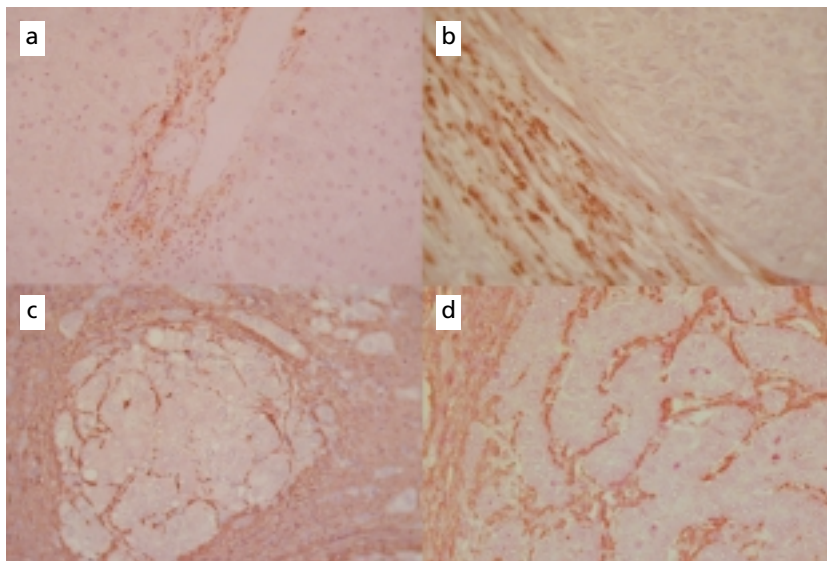
3. táblázat. A májmintákban kimutatható jellegzetes proteoglikán-változások. Ötven májrák-környező máj vizsgálatát végeztük el. A krónikus hepatitis-cirrhosis minták elsősorban túbiopsziás anyagok voltak.

	Syndecan- 1	Decorin	Perlecan	Agrin	CD44
Ép máj	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Cirrhosis	+++ mag	+++	+++	+++	+++
Májrák	+/-	+/-	++	+++	?
Májrák+cirrhosis	+++ mag	+++ mag	+++	+++	+++
Peritumor. máj	+++	+/-	+/-	+/-	++

4. ábra. Syndecan-1 immunreakció ép májban (a), cirrhosisal nem szövődött májrákban (b), májcirrhosisban (c) és cirrhoticus májban kialakult májrákban (d). Látható, hogy a daganatokban a syndecan fehérje elrendeződése egyenetlen, összességében a cirrhoticus tumorban mennyisége fokozódik, a nem cirrhoticusban inkább csökken.



5. ábra. A decorin lokalizációja a májban. Ép májban csak a portális háromszög körüli kötőszövetben van csekély decorin (a). Májcirrhosisban az allebenyeket létrehozó kötőszövetben nagy mennyiségben figyelhető meg a fehérje lerakódása. A decorin behatol a szinuszoidokba is (c). A cirrhosisal nem szövődött májrákban a tumor strómája nem tartalmaz decorint, a daganatos göböt viszont decorindús stróma veszi körül, mintegy elhatárolva azt a környezetétől (b). A cirrhoticus májban kialakuló májrákok bőségesen tartalmaznak decorint strómájukban (d).



szinuszoidok mentén. A májcirrhosisban a legmarkánsabb eltérés a decorin felszaporodása. Mellette megfigyelhető, hogy a bazális membrán HS-proteoglikánok, a perlecan és az agrin a proliferáló epeutakat és kis ereket rajzolják ki, és lerakódnak a rostos kötőszövetben is. Az agrin és a perlecan között lényeges különbség, hogy az előbbi nem mutatható ki a szinuszoidok mentén kialakuló bazális membránban. Az ép májban agrint eddig nem tudtak kimutatni, felszaporodásáról a májbetegségekben a jelen közlemény elsőként számol be. Ez a különbség azért lényeges, mert a májrákok neovaszkulaturáját viszont kirajolja az agrin, differenciáldiagnosztikai eszközt adva a vizsgáló kezébe. Egyidejűleg, az adat arra is utal, hogy a daganatos kapillárisok szerkezete eltérő.

A syndecan-1 mennyiségi változásainál sokkal jellegzetesebb az, hogy károsodás esetén gyakran hiányzik a sejtfelszínről, a citoplazmában van. Néha megjelenik a magban. Kérdés, hogy ki sem megy a sejtől vagy újra internalizálódik?

A májcirrhosis és a májrák kapcsolata bonyolult kérdés. Magunk úgy gondoljuk, hogy a májcirrhosis a hepatokarcinogenezis promóciójában játszik szerepet, tehát a két folyamat sok szempontból egymástól független entitás. A fibrogenézis és cirrhosis főszereplői a kötőszöveti sejtek, míg a májráké a transzformált hepatociták. Adataink arra utalnak, hogy a fibrogenézis folyamata során a kötőszöveti sejtek elkötelezetté válnak egy olyan program végrehajtására, melyet a tumorsejtek felől jövő újabb, a mátrix átalakítását célzó, vagy a környezet felől kiinduló és a tumor elleni védekezést célzó jelek sokszor már nem tudnak áttörni. Ilyen esetben azok a jellegzetességek, melyeket a nem cirrhoticus májban kialakuló rákoknál írtak le, eltűnnek. A májrákokban megfigyelhető változásokat tehát befolyásolja, hogy a tumor cirrhoticus vagy nem cirrhoticus májban alakult ki.

A cirrhosis-mentes májban a májtumorok strómája nem tartalmaz decorint, és a syndecan-1 mennyisége is csökken. Ugyanakkor a cirrhoticus májban kialakuló tumorokban a syndecan-1 csökkenése sokkal ritkábban figyelhető meg, és a decorin a tumoros stróma szerves része (4., 5. ábra).

Nem befolyásolja a cirrhosis jelenléte a májrákokban az agrin és a perlecan felszaporodását. Mindkét fehérje a tumoros mikrovaszkulatura bazális membránjának komponense. Mivel a májcirrhosis kapillarizációja során az agrin nem rakódik le a bazális membránban, ez a fehérje alkalmas a tumor és a diszplasztikus májszövet differenciálására (6. ábra).

Munkacsoportunk nem vizsgálta a versican és a glypican-3 expresszióját. A versicanról jelenleg nincsenek adatok, de felszaporodását számos más daganatban leírták. Szinte biztosra vehető, hogy a májrákban felszaporodott CS versican vázfehérjéhez kapcsolva van jelen. A glypican-3 expressziójának fokozódása a májrákok egyik jellegzetessége (4, 46).

Miért rossz, ha a proteoglikánok mennyisége, minősége és lokalizációja megváltozik a májban?

A proteoglikánok és szabályozó faktorok kölcsönhatása

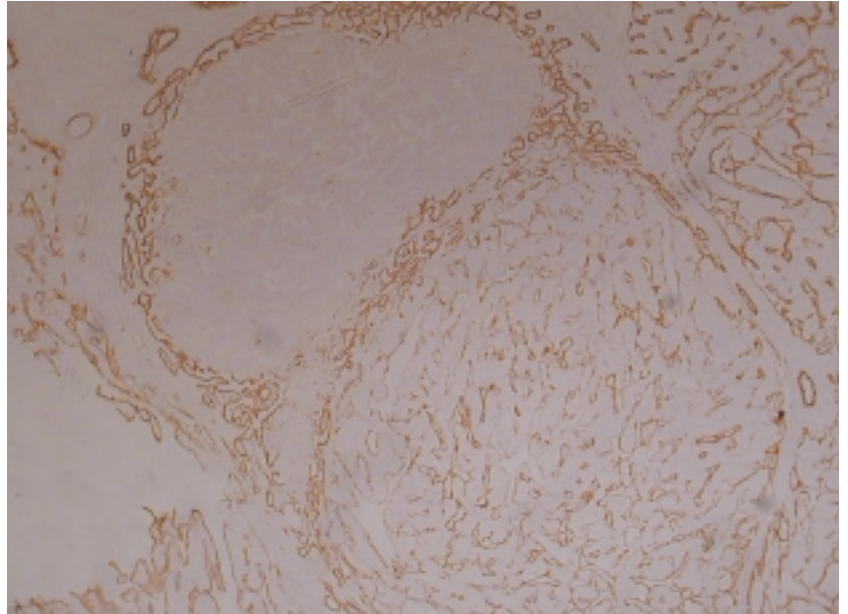
Az elmúlt években birtokunkba jutott ismeretanyagból a legizgalmasabbak azok az adatok voltak, melyek bizonyították, hogy az ECM fehérjéi közül a proteoglikánok növekedési faktorok kötése, tárolására, prezentálására, aktiválására és inaktíválására képesek (12, 35, 36). Ez a funkció végbemehet a molekula fehérjéjének részvételével, ilyen a TGF- β 1 inaktíválása decorin vázfehérjével, vagy a betaglycan TGF- β 1-kötése (43). Az esetek nagyobb részében azonban a molekulák cukorláncok aktív. A legismertebb faktorok, melyeket a cukorláncok kötnek, az FGF (35) család, a HGF, de az IFN- γ , IL-3, GM-CSF, TNF- γ és TGF- β 1 szintén képes heparánszulfáthoz kötődni. A felsorolt molekulák mindegyike, de főleg a bFGF, TGF- β 1 és TNF- α fontos szerepet játszik a tumorok növekedésében és terjedésében is (8). A heparánszulfátok struktúrájuktól függően gátolni, vagy stimulálni képesek a daganatinvázcióban fontos szerepet játszó szerin-proteázokat is (33). A heparánszulfátok moduláló hatásának számos esetben nélkülözhetetlen részese a heparanáz enzim, mely a heparánszulfát bontásával képes felszabadítani a cukorlánchoz kötött molekulákat (25). A cukrok szerkezetének, lokalizációjának megváltozása befolyást gyakorol ezeknek a fontos szabályozó molekuláknak a működésére, melyek rossz időben, rossz helyen lesznek jelen.

HS-proteoglikánok és jelátvitel

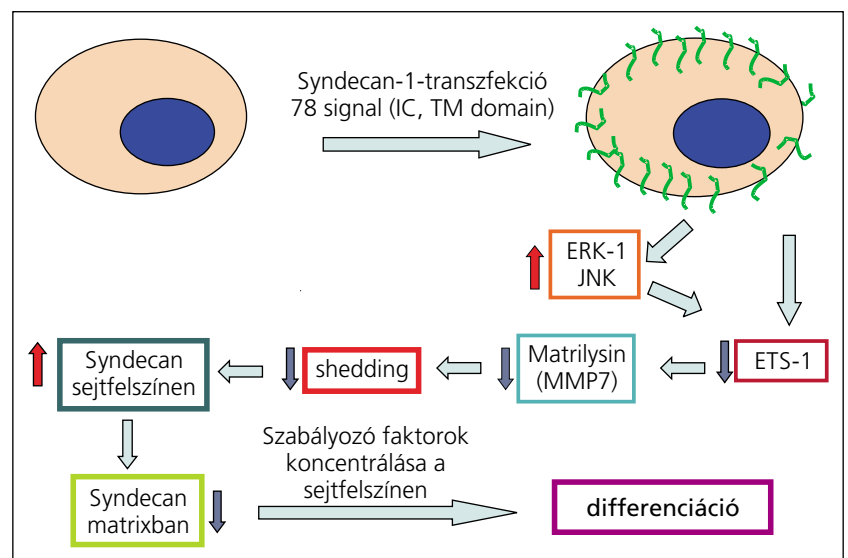
Bizonyos növekedési faktorok képtelenek heparánszulfát nélkül sejtfelszíni receptorukhoz kötődni, és hatásukat kifejteni. Ezek közül a legismertebb a bFGF (14, 34, 42). A sejtfelszíni HSPG-k heparánszulfátja fontos szerepet játszik a wnt jelátvitel szabályozásában is. Syndecan $-/-$ egereken a wnt jelátviteli út aktiválása ellenére nem jött létre emlőrák (1). Ennek a jelátviteli útnak a károsodása gyakran kimutatható a májrákokban is (41). Saját munkánkban, ahol a syndecan-1 szerepét próbáljuk megérteni a molekula csonkolt formáival végzett transzfekciót követően, azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy az intracelluláris és transzmembrán domén a kis extracelluláris DRKE peptid-motívummal együtt differenciáltatja a hepatomasejteket. A sejtek növekedése lassul, albumintermelésük és az aszialoglikoprotein-receptor expressziója fokozódik. Adhezivitásuk megnő, a homotipias kapcsolatok is gyorsabban alakulnak ki, miközben a claudin 1 és 7 tight junction fehérjék mennyisége fokozódik. Adataink azt sugallják, hogy az események, melyeket a shedding (a syndecan extracelluláris doménjének lehasadása) utáni állapot utánzása indít el, részben a MAPK úton keresztül aktiválódnak. Nagyon fontos tehát, hogy a tumorokban zajlik-e a syndecan-1 sheddingje, vagy nem (2, 5, 10). Először myelomáknál, majd

tüdőráknál közölték le, hogy a fokozott shedding miatt a szérumban megemelkedő syndecan-1-szint rossz prognózist jelent (6, 20, 45). A syndecan lehasadása eltávolítja a sejtek felszínéről a szabályozó faktorokat, és ezek az ECM-ben rekedve kedveznek a tumoros progressziónak. Saját rendszerünkben a csonkolt syndecan-1 transzfektálásával éppen ezt a sheddinget gátoltuk (7. ábra).

6. ábra. A bazális membrán HS-proteoglikán agrin lokalizációja cirrhotissal szövődött májrákban. Erős pozitívítás látható a burjánzó epeutak és erek bazális membránjában, pozitívak a tumoros göb strómájában futó erek. Ugyanakkor a cirrhoticus göb szinuszoidjaiban nem látható reakció. Ez egyértelműen megkülönbözteti a rákos és nem rákos szövetet.



7. ábra. A syndecan-1 csonkolt fehérje, mely az intracelluláris (IC), transzmembrán (TM) doméneket és az extracelluláris domén első 4 aminosavát (DRKE) tartalmazza. A csonkolt fehérje folyamatos kifejeződése aktiválja a MAP-kináz jelátviteli utat. Az aktiválás módja még nem tisztázódott, de feltételezhető, hogy a csonkolt fehérje dimerizációja az első lépés. Csökken az ETS-1 onkogén magi reprezentációja. Ennek következtében csökken a matrilysin (MMP7) expressziója. Az MMP7 csökkenése miatt az endogén syndecan-1 extracelluláris doménje nem hasad le, a sejt működését szabályozó faktorok a sejtfelszínen maradnak.



A decorin és a differenciáció

Iozzo mutatta ki, hogy a decorin ligandja lehet az EGF-receptornak, és a kötődés hatására a laphámráksejtek differenciálódnak, miközben a p21 ciklindependens kinázgátló expressziója fokozódik (37). Az IGF-receptorhoz kötődve endotélsejteken a decorin befolyásolja az AKT foszforilálódását, és fokozza nemcsak a p21, hanem a p27 expresszióját is. Az utóbbi folyamat során az endotélsejtek vérüröket formálnak (38). Saját vizsgálataink szerint a decorin bejuthat a sejtmagba is. Ezt a jelenséget Hep3B sejteken észleltük, s arra utal, hogy bár a májsejtek nem termelnek decorint, a malignus transzformáció során a fehérje újra termelődni kezd, vagy a tumorsejtek képesek a decorin felvételére.

Jelenleg nem tudjuk, miért stimulálja a tumor specifikusan az agrin termelését. Az mindenesetre kétségtelen, hogy a fehérje a bFGF-fel és az endotélsejt-marker CD31-gyel szoros kolokalizációban fejeződik ki, tehát feltételezhető, hogy szerepe a tumoros neoangiogenezisben van.

Heparánszulfát a magban

Az extracelluláris mátrixból a heparánszulfát egyesek szerint a sejtmagba juthat. A bejutás módja ma még nem teljesen tisztázott, feltehetően az endocitózissal citoplazmába jutott cukorláncok valamilyen fehérje (bFGF?) kíséretében kerülnek be a magba (16). A máj és májráksejtek összehasonlítása arra utalt, hogy a daganatsejtek magjában található HS szerkezetileg eltér a normális sejtekben kimutatottól (7, 21). A magi HS szerepet játszik a kontakt gátlásban, a hatásmód azonban nem ismert. Mindenesetre a heparin az egyik fehérjefoszforiláló enzim, a kazeinkináz fő gátlója (15). Gátolja a telomeráz enzim aktivitását is (8). Leírták róla azt is, hogy képes transzkripciós faktorok hatását felfüggeszteni, és fontos magi enzimek működését gátolni (7, 21).

A HS-ek magi szabályozó szerepéről hosszú évek óta jelentek meg elszórt közlemények (3, 9, 18). Lehetséges szerepüket a magi szabályozásban annak ellenére kétségbe vonták, hogy számos magi fehérje heparinkötődése alapján tisztítható (19, 40). A transzkripciós faktorok, növekedési faktorok és a topoizomeráz I tisztítása Heparin-Sepharose oszlopon történik.

A különböző szövettani sejtek magja, és az ezekből izolált, elsősorban nonhisztin fehérjéknek megfelelő magi frakciók magas ionerősségnél (0,6 M NaCl) is kötni képesek a biotinált heparint, míg a citoplazma-fehérjék nem mutatnak különösebb affinitást a heparin iránt. A kutatók ezt elsősorban a fehérjék bázikus tulajdonságával magyarázták. Szemben a töltésen alapuló interakcióval, az utóbbi időben több közlemény számolt be arról, hogy számos növekedési faktor (bFGF, HGF) specifikus oligoszacharid struktúrához kötődik. Mi azt tételezzük fel, hogy a magi heparinkötő fehérjék interakciója a HS-sel speciális szerkezetet igényel mind a fehérje, mind a cukor részéről, és az így létrejött kapcsolatnak fiziológiai jelentősége is van.

Saját eredményeink szerint a p53 és a topoizomeráz II nem tartoznak a heparin kötő molekulák közé, míg a topoizomeráz I, bFGF és a PCNA erősen heparinkötő sejtmagi fehérje (23). Sejtes rendszereken is szaporodnak az adatok, melyek szerint a GAG-ok illetve PG-k magi működéseket képesek befolyásolni. Leírták, hogy a heparináz enzim hatására a mátrixból diszacharid egység szabadul fel, mely T-limfocitákon transzkripciós szinten gátolja a TNF- α expresszióját (26). Heparin kezelés hatását követően a junfos AP-1 heterodimer nem tud a DNS-hez kötődni (3, 7). Talán ez a magyarázata annak, hogy a heparin képes simaizomsejtek, sőt daganatsejtek szaporodását gátolni (29).

Saját és mások in vitro vizsgálatainak biológiai jelentőségét támogatják megfigyeléseink, melyek szerint a biotinnal jelzett heparin és HS 4 órán belül bejut a sejtmagba (21). Ennek tükrében fokozódik a jelentősége azoknak az eredményeinknek, melyek bebizonyították, hogy a topoizomeráz I és II aktivitását az ép májból származó HS gátolja, míg a májrákból származó HS nem. A heparin és máj HS topoizomeráz I-gátló hatását sejtes rendszerben is igazolni tudtuk. Mivel a HS a DNS-sel vetélkedik a topoizomeráz I kötéseért, befolyásolja a topoizomeráz I-gátló topotecan hatékonyságát is. Kevésbé volt hatékony a tumoros HS a transzkripciós faktorok DNS-kötődésének gátlásában is. A májrák HS sokkal gyengébben gátolta az AP-1, TF IID és SP1 transzkripciós faktorok DNS-kötését, mint az ép májból kinyert GAG. Ugyanakkor az ETS-1 interakciót a tumoros HS gátolta jobban. Felvetődik újra a kérdés, hogy csak a HS-ek szulfatáltságbeli eltérése áll-e a különbségek hátterében? A tény, hogy az igen magasan szulfatált heparin gátló hatása a tumoros HS-énél is csekélyebb volt, ismét arra utal, hogy a megfelelő hatás eléréséhez speciális HS-struktúrára van szükség. A HS magi szabályozó szerepe körüli ellentmondások magyarázata feltehetően éppen a heparin és egyéb GAG-ok szerkezetének variabilitásában rejlik. A mi vizsgálataink során használt HS-ek az immunvizsgálatok alapján peritumorális máj esetén elsősorban syndecan-1-, a májrákból izolált mintákban pedig perlecan- és agrin-eredetűek (23). A diszacharid-vizsgálataink szerint a tumoros és nem tumoros eredetű HS-ek diszacharidjai elsősorban a glükózamin 6-O-szulfatáltság mértékében tértek el, a tumoreredetű HS vesztett a 6-O-szulfatáltságból. Ezek a változások, bár kis mértékűek, részben magyarázhatják a biológiai aktivitásokban tapasztalt különbségeket, nevezetesen azt, hogy szemben az ép májból származóval, a tumoros HS nem gátolja a topoizomeráz I aktivitását és a transzkripciós faktorok DNS-kötését.

Zárószó

A proteoglikánok szerepét a sejtek és szövetek biológiai viselkedésében egyre többen fogadják el tényként. Ismertségük és elismertségük azonban még mindig messze elmarad egyéb, a patológiai eseményekben fontosnak tartott molekuláktól. Bízom benne, hogy az elmondottak érzékeltették

a biológiai folyamatok széles skáláját, melyekben molekuláink az aktív játékosok között szerepelnek. Bármilyen irányból indul is el a kutató, ismerve a proteoglikánok széleskörű szerepét a biológiai eseményekben, joggal számíthat rá, hogy egyszer csak szembetalálja magát ezekkel a molekulákkal, legyen az esemény fizio- vagy patológiás, mint a regeneráció, sebgyógyulás, gyulladás, daganat, vagy degeneráció.

Irodalom

- Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, et al. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* 25:329-232, 2000
- Beauvais DLM, Rapraeger AC. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* 2:3, 2004
- Busch SJ, Martin GA, Barnhart RL, et al. Trans-repressor activity of nuclear glycosaminoglycans on fos and jun/AP1 oncoprotein mediated transcription. *J Cell Biol* 116:31-42, 1992
- Cattaruzza S, Sciappacassi M, Kimata K, et al. The globular domains of PGM/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J* 18:779-781, 2004
- Derksen PWB, Keehnen RMJ, Evers LM, et al. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood* 99:1405-1410, 2002
- Dhodapkar MV, Sanderson RD. Syndecan-1 (CD138) in myeloma and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma* 34:35-43, 1999
- Dudás J, Ramadori G, Knittel T, et al. Effect of heparin and liver heparan sulfate on interaction of HepG2 derived transcription factors and their cis-acting elements; altered potential of hepatocellular carcinoma HS. *Biochem J* 350:245-251, 2000
- Engelberg H. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer* 85:257-271, 1999
- Fedarko NS, Ishihara M, Conrad HE. Control of cell division in hepatoma cells by exogenous heparan sulphate proteoglycan. *J Cell Physiol* 139:287-294, 1989
- Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, et al. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 148:811-824, 2000
- Forsberg E, Kjellén L. Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J Clin Invest* 108:175-180, 2001
- Forsten KE, Fannon M, Nugent MA. Potential mechanisms for the regulation of growth factor binding by heparin. *J Theor Biol* 205:215-230, 2000
- Fransson LA. Structure and function of cell-associated proteoglycans. *TIBS* 12:406-411, 1987
- Guimond SE, Turnbull JE. Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides. *Curr Biol* 9:1343-1346, 1999
- Hathaway GM, Lubben TH, Traugh JA. Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem* 255:8038-8041, 1980
- Hiscock DR, Yanagishita M, Hascall VC. Nuclear localization of glycosaminoglycans in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 269:4539-4546, 1994
- Iozzo RV. Biology of disease: Proteoglycans: Structure, function, and role in neoplasia. *Lab Invest* 53:373-396, 1985
- Ishihara M, Fedarko NS, Conrad HA. Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes. *J Biol Chem* 261:13575-13580, 1986
- Ishii K, Futaki S, Uchiyama H, et al. Mechanism of inhibition of mammalian DNA topoisomerase I by heparin. *Biochem J* 241:111-119, 1989
- Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, et al. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res* 62:5210-5217, 2002
- Kovalszky I, Dudás J, Oláh NJ, et al. Inhibition of DNA topoisomerase I by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biochem* 183:11-23, 1998
- Kovalszky I, Pogány G, Molnár G, et al. Altered glycosaminoglycan composition in reactive and neoplastic human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 167:883-889, 1990
- Kovalszky I. Proteoglikánok az ép májban, cirrhosisban és májrákban; Értekezés az MTA doktora cím elnyeréséhez. Budapest, 1999
- Kupchella CE, Baki-Hashemi S. Glycosaminoglycans in and around transplantable hepatomas of varying growth rates and metastatic characterisations. In: *Extracellular Matrix*, Academic Press Inc. 1982, pp 183-187
- Lapierre F, Holme K, Lam L. Chemical modification of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, antitumor and antimetastatic properties. *Glycobiology* 6:355-366, 1996
- Lider O, Cahalon L, Gilat D, et al. A disaccharide that inhibits tumor necrosis factor alpha is formed from the extracellular matrix by the enzyme heparanase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5037-5041, 1995
- Lyon M, Deakin JA, Gallagher JT. Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *J Biol Chem* 269:11208-11215, 1994
- Lyon M, Gallagher JT. Purification and partial characterization of major cell-associated heparan proteoglycan of rat liver. *Biochem J* 273:415-422, 1991
- Mason HR, Nowak RA, Morton CC, Castellet JJ. Heparin inhibits the motility and proliferation of human myometrial and leiomyoma smooth muscle cells. *Am J Pathol* 162:1895-1904, 2003
- Merry CL, Lion M, Deakin JA, et al. Highly sensitive sequencing of the sulfated domains of heparan sulfate. *J Biol Chem* 274:18455-18462, 1999
- Nakamura N, Hurst RE, West SS. Biochemical composition of heterogeneity of heparan sulphate isolated from AH 130 ascites hepatoma cells and fluid. *Biochem Biophys Acta* 538:445-457, 1978
- Nakamura N, Kojima J. Changes in charge density of heparan sulphate isolated from cancerous human liver tissue. *Cancer Res* 41:271-283, 1981
- Pratt CW, Whinna HC, Church FC. A comparison of three heparin-binding serin proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 267:8795-8801, 1992
- Rapraeger AC, Guimond S, Krufka A, Olwin BB. Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling. *Methods Enzymol* 245:219-240, 1994
- Rapraeger AC. In the clutches of proteoglycans: how does heparan sulfate regulate FGF binding? *Chem Biol* 2:645-649, 1995
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867-869, 1991
- Santra M, Skorski T, Calabretta B, et al. De novo decorin gene expression suppresses malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7016-7020, 1995
- Decorin affects endothelial cells by Akt-dependent and -independent pathways. *Ann NY Acad Sci* 973:149-152, 2002
- Selleck SB. Proteoglycans and pattern formation. *TIG* 16:206-212, 2000
- Sullivan DM, Latham MD, Rowe TC, Ross WE. Purification and characterization of an altered topoisomerase II from a drug-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Biochemistry* 28:5680-5687, 1989
- Suriawinata A, Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 24:77-88, 2004
- Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 32:269-88, 2000
- Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-284, 1990
- Yamamoto K, Terayama H. Comparison of cell coat acid mucopolysaccharides of normal liver and various ascites hepatoma cells. *Cancer Res* 33:2257-2264, 1973
- Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 100:610-617, 2002
- Zheng PS, Wen J, Ang LC, et al. Versican/PG-MG3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* 18:754-756, 2004