

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az oszteopontin expresszió szerepe a malignus melanoma progressziójában

Kiss Tímea

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023

AZ OSZTEOPONTIN EXPRESSZIÓ SZEREPE A MALIGNUS MELANOMA PROGRESSZIÓJÁBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Egészségtudományok tudományágban

Írta: **Kiss Tímea** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Megelőző Orvostan és Népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora
Dr. Paholcsek Melinda, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet A épület, Könyvtár
2024. április 17. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Lontay Beáta, PhD
Dr. Tóvári József, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora
Dr. Paholcsek Melinda, PhD
Dr. Lontay Beáta, PhD
Dr. Tóvári József, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2024. április 17. 13:00 óra
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

BEVEZETÉS

A malignus melanoma az egyik legagresszívabb humán bőrdaganat, mely világszerte jelentős népegészségügyi problémát jelent. Előfordulása ritkább más bőrdaganatokhoz képest, mégis a legtöbb halálozásért felelős típusnak tekinthető, köszönhetően a gyors áttétképzési hajlamának és fokozott gyógyszerrezisztenciájának. A betegség kialakulásában számos genetikai és környezeti tényező együttes kölcsönhatása játszik szerepet, multifaktoriális etiológiával jellemezhető. Évente 324.635 új esetet regisztrálnak világszerte, amelyből 57.043 végződik halállal; azonban a kormegoszlásra standardizált előfordulása (esetek száma/100.000 fő) eltérő. Globális incidenciája folyamatosan növekszik, főleg a fehér bőrű populációkban. A daganat korai felismerése és azonnali eltávolítása döntő fontosságú az optimális kezelés és a jobb kimenetel érdekében.

A melanoma molekuláris háttere

A malignus melanoma agresszív természete mellett heterogén biológiai viselkedéséről is ismert, molekuláris patogenezisében több jelátviteli út vonal vesz részt. Az elmúlt évtizedekben számos fontos molekuláris útvonalat fedeztek fel, amelyek szerepet játszanak a betegség kialakulásában. Ide tartozik a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) út vonal és a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát-3-kináz (PI3K)/AKT út vonal, melyek vezető szereppel bírnak a melanoma genézisben, a daganatsejtek proliferációjában és túlélésében.

Biomarkerek szerepe a daganatok biológiájában

Az elmúlt években a tumorbiológia, a genomika és a molekuláris technológiák jelentős fejlődése számos új biomarker azonosítását eredményezte. A tumor biomarkerek a következő csoportokba sorolhatóak: diagnosztikus, prognosztikus és prediktív. A diagnosztikus biomarkerek a daganatok jelenlétének kimutatására és megerősítésére szolgálnak, lehetővé téve az esetleges kiújulások korai felismerését. A prognosztikus biomarkerek a betegség valószínű lefolyását és lehetséges kimenetelét jelzik előre, míg a prediktív biomarkerek egy adott kezelésre adott valószínű válasz értékelésére szolgálnak.

Az oszteopontin és a daganat progresszió

Az oszteopontint (OPN) más néven SPP1 (secreted phosphoprotein 1), vagy ETA-1 (Early T-lymphocyte Activation 1 protein) először csontszövetben azonosították. Egy olyan multifunkcionális extracelluláris mátrixfehérje, amely 314 aminosavból áll és az SPP1 gén kódol, valamint a 4. humán kromoszómán található. Az OPN-t különböző sejttípusok termelik, és többféle daganatos megbetegedésben is magas szinten expresszálódik, többek között emlő-, vastagbél-, gyomor-, máj-, hasnyálmirigy-, tüdődaganatokban és melanomában. Kiterjedt microarray-elemzések azt mutatják, hogy az OPN-nak komoly szerepe van a melanoma progressziójában. Az irodalmi adatok alapján, az OPN overexpressziója gyakran fokozott tumorinvázióval, áttétképződéssel és magas fokú malignitással jár együtt.

Számos tanulmány szerint az OPN a daganatterápia specifikus célpontja lehet. Összességében az OPN antimetasztatikus és antitumorogén hatást fejt ki különböző rosszindulatú daganatos megbetegedésekben.

A melanoma jelenlegi és új célzott terápiái

A korán diagnosztizált melanoma sebészi eltávolítása rendkívül hatékony módszer a betegség kiújulásának megelőzésére. Az előrehaladott stádiumú melanoma esetében a dakarbazinos kemoterápia (DTIC) és a nagy dózisú interleukin-2 (IL-2) volt a terápiás standard a RAF-gátló vemurafenib és a CTLA-4 antitest ipilimumab 2011-es engedélyezéséig. A melanoma driver génjeinek felfedezése döntő szerepet játszott a célzott terápiák kifejlesztésében.

Emellett a molekuláris biológia legfontosabb előrelépése volt annak felfedezése, hogy a kis interferáló RNS-ek (siRNS-ek) képesek a génexpressziót RNS-interferenciával (RNSi) szabályozni. siRNS-alapú kezelések reményteljes génalapú terápiák lehetnek a daganatok kezelésére, mivel számos gén a tumor kialakulásának bizonyos szakaszaiban upregulálódik, és hozzájárul a sejtproliferációhoz és a tumor progressiójához. Az siRNS-alapú terápiák célpontjai három fő csoportra oszthatók, beleértve a tumor kialakulásában részt vevő molekulákat, a tumor-gazda interakciókban részt vevő géntermékeket és a kemoterápiás szerekkel szembeni tumorrezisztenciában szerepet játszó géntermékeket.

CÉLKITŰZÉSEK

A kutatásunk célja az volt, hogy mélyebben megértsük az OPN expressziójának szerepét a melanoma progressziója során. Célunk volt továbbá, hogy megvizsgáljuk az OPN expresszióját különböző biológiai viselkedésű primer tumorszövetben. Ezt követően megvizsgáltuk az OPN expresszió kis interferáló RNS (siRNS) segítségével történő gátlásának hatását a sejtproliferációra és az invázióra, azzal a céllal, hogy feltárjuk azokat a molekuláris mechanizmusokat, melyek az OPN melanoma progressziójában való részvételének hátterében állnak.

Vizsgálataink céljait az alábbi csoportokba sorolhatjuk:

1. Az OPN expressziójának meghatározása mRNS- és fehérje szinten a primer melanomák különböző altípusaiban, valamint az expressziós mintázatok összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel.
2. Az OPN mRNS és fehérje expressziójának meghatározása különböző biológiai viselkedésű melanoma sejtvonalakban. Az expressziós eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel, valamint a BRAF mutációs státuszával.
3. Az OPN expresszió gátlása siRNS segítségével, olyan specifikus melanoma sejtvonalakban, amelyek magas OPN-expressziót mutatnak. A transzfekció hatása a sejtek proliferációjára és invazív képességére.
4. Az eredeti és transzfektált sejtvonalak fehérje mintázatának összehasonlítása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Melanoma szöveti minták

A melanoma szövetek a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájáról származtak. Az értekezésben ismertetett kutatás a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága és az Orvosi Kutatási Tanács jóváhagyásával történt a vonatkozó szabályozások figyelembevételével. A betegek aláírták a kutatásba beleegyező nyilatkozatot. A tumorok diagnosztizálása formalin fixált paraffinba ágyazott (FFPE) szöveti metszetek hematoxin&ezoin festését követően történt a Bőrgyógyászati Klinikán. A klasszifikációhoz a TNM besorolási rendszer legújabb verzióját alkalmaztuk. Mivel a melanoma szövetek OPN expressziójának vizsgálata nem egy időben történt, így a vizsgált melanoma minták nem voltak komplett átfedésben.

Sejttenyésztés

Vizsgálatainkat 12 primer tumor (WM35, WM793B, WM3211, WM902B, M35/01, WM1361, WM1366, HT199, WM39, WM3248, WM278, WM983A) és 8 metasztázis eredetű melanoma sejtvonalakon (WM1617, WM983B, SK-MEL-28, A2058, HT168-M1, M24, M24met, Melur) végeztük. A sejteket RPMI 1640 (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) vagy MCDB153-L15 tápfolyadékban (Sigma-Aldrich Co. LCC, St Louis, Missouri, USA) tenyésztettük 5-10%-os foetal bovin szérum (Gibco, Carlsbad, California, USA) tartalommal, 37°C-os termosztátban 5% CO₂ tartalom mellett.

A BRAF és NRAS gének mutációs analízise

A melanoma sejtvonalak többségének BRAF és NRAS mutációs státusza ismert volt. Hat sejtvonal esetében pedig (A2058, HT168-M1, M24, M24met, HT199, WM902B) a BRAF^{V600} és NRAS^{Q61} kodonokban előforduló mutációkat LightCycler rendszeren (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) olvadáspon analízissel detektáltuk fluoreszcens próbákat alkalmazva (TIB Molbiol, Berlin, Németország).

RNS extrakció és valós idejű qRT-PCR

A totál RNS izolálást RNeasy Mini kit segítségével végeztük (Qiagen GmbH, Hilden, Németország), és a mintákat NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel kvantifikáltuk (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). A reverz transzkripciót (RT) 600 ng teljes RNS-en végeztük el a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével, a gyártó utasításait követve (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornia, USA).

TaqMan egy lépéses RT-PCR-t alkalmaztunk az *OPN* mRNS szintjének meghatározására 28 primer melanoma szövetben, reakciónként 3 ismétléssel ABI-PRISM 7000 készüléken (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). A PCR Master Mixet és az assay-t (Hs00167093_m1 *OPN* targeting the exon 3-4 boundary) a Life Technologies-től szereztük be.

A későbbi vizsgálatainkban az *OPN* relatív expressziós szintjét LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) berendezéssel vizsgáltuk. Ezt az elemzést 34 primer melanoma és 8 melanoma metasztázis, valamint 12 primer - és 8 metasztázis

eredetű sejtvonalon végeztük el. A reakciókhoz SYBR premix Ex Taq (Takara Holding Inc., Kyoto, Japán) master mixet használtunk.

Az adatelemzést Livak módszerrel végeztük, a belső kontroll GAPDH, a kalibrátor minta 8 különböző személytől származó naevus minta, illetve tenyésztett melanocita volt.

Szöveti microarray-k és immunfestés

Az eredeti blokkokból származó szöveti metszeteken hematoxilin-eozin festést követően patológusok segítségével behatároltuk a tumorsejt dús területeket, és ahol lehetett, mintánként három 1 mm átmérőjű blokkot vágunk ki automatizált TMA Master (Carl Zeiss, Jena, Németország) segítségével. Az így elkészült TMA blokkokból 4µm-es metszeteket készítettünk, melyeken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk hematoxili-eozin festéssel történt validációt követően. A paraffin eltávolítását, az endogén peroxidázok és nem specifikus kötőhelyek blokkolását követően az antigéneket forrásban levő citrát pufferrel tártuk fel (pH 6). Az OPN elleni elsődleges antitestet a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) cégtől szereztük be. A primer antitestekkel történt inkubációt követően a fehérje expressziót Envision/HRP detekciós rendszerrel (DAKO Inc., Glostrup, Dánia) és VIP peroxidáz szubsztrát kittel (Vector Laboratories LTD, Peterborough, UK) vizualizáltuk. A sejtmagokat metilzölddel festettük (Vector Laboratories LTD). Negatív kontroll esetében kihagytuk a primer antitestet. A pozitív kontrollként a méhnyakrák eredetű HeLa sejtvonalat használtuk. A festett lemezeket MiraxScan szkennelvel digitalizáltuk (Carl Zeiss). Az így kapott képeket MiraxViewer szoftver

segítségével jelenítettük meg (Carl Zeiss), majd a kiértékelést 2, a minták klinikai-patológiai adataira vak dermatopatológus végezte. A reakció pozitivitást kétféleképpen értékeltük: a festődést mutató sejtek százalékos aránya (0 = nincs, 1+ = <5%, 2+ = 5-50%, 3+ = >50%) és a festődés intenzitása (0 = nincs, 1+ = gyenge, 2+ = közepes, 3+ = erős) szerint.

Indirekt immunfluoreszcencia

A melanoma sejteket 8 lyukú Lab-Tek kamrás tárgylemezeken (Nalge Nunc International, Naperville, IL) tenyésztettük egy éjszakán át RPMI 1640 tápfolyadékban (Lonza Group Ltd, Basel, Svájc), amely 10% FBS-t (Gibco, CA, USA) tartalmazott. A sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd acetonnal fixáltuk és levegőn szárítottuk. Ezt követően a sejteket PBS-sel öblítettük (15 perc), majd 5%-os BSA-val blokkoltuk szobahőmérsékleten 30 percig. Az elsődleges antitesteket, köztük az 1:500-ra hígított anti-OPN antitestet (Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA) és az 1:50-re hígított anti-NF- κ B p65 antitestet (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA) egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk a sejtekkel. PBS-sel történő öblítést követően a sejteket DyLight488-konjugált anti-nyúl vagy DyLight594-konjugált anti-nyúl IgG-vel (Vector Laboratories Ltd, Peterborough, UK) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Egy újabb PBS mosást követően a sejtmagokat 4'6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI, Vector Laboratories Ltd, Peterborough, UK) festettük meg. A képeket konfokális lézerpászttázó mikroszkóppal (Zeiss LSM700, Carl Zeiss) elemeztük.

Sejtproliferációs assay

A sejtek proliferációját WST-1 assay-el (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) határoztuk meg. A méréseket 78 órával a siRNS transzfekció után végeztük. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük NanoDrop UV-Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

Inváziós assay

Az inváziós képesség meghatározásához BD Biocoat Matrigel inváziós kamrákat használtunk (pórus méret: 8 μm ; BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA). A felső karma 500 μl sejtuszuspenziót tartalmazott szérumentes tápfolyadékban (5×10^4 sejt/kamra). Az alsó kamrában 10% szérumot tartalmazó tápfolyadékot használtunk kemoattraktánsként. 24 óra inkubáció után az alsó kamrába átjutó sejteket metanollal fixáltuk és hematoxylin-eosinnal festettük. Az invazív sejteket fénymikroszkóp alatt 200x-os nagyításon 7 különböző látótérben számoltuk le és átlagoltuk.

siRNS vizsgálatok

A humán szekretált foszfoprotein 1 (SPP1; OPN-célzó siRNS: ID: SI02757615) és az AllStars negatív kontroll siRNS-t (NC-siRNS ID: 1027281) a Qiagen GmbH-től (Hilden, Németország) vásároltuk.

Egy nappal a transzfekció előtt a sejteket 24 lyukú lemezekbe helyeztük, lyukanként 5×10^4 sejt sűrűséggel, és 500 μl antibiotikum nélküli tápfolyadékban 30-50%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük. A transzfekcióhoz siRNS, duplex-Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens

(Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) komplexeket készítettünk a gyártó protokollja szerint, ami 100 μ l végső térfogatot és 5 nM siRNS végső koncentrációt eredményezett. A 3 órás inkubáció után a tápfolyadékot friss tápfolyadékra cseréltük. A sejteket 48 órával a transzfekció után előkészítettük a későbbi elemzéshez és a géncsendesítés hatékonyságát qRT-PCR segítségével értékeltük.

Fehérje expressziós vizsgálatok

A sejteket proteáz és foszfatáz inhibitorokat tartalmazó RIPA pufferben szüreteltük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A totál protein koncentrációkat Bradford assay segítségével határoztuk meg (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország) a gyártó protokollja szerint. A fehérje expressziós vizsgálatokhoz a Proteome Profiler Human XL Oncology Array Kit-et használtuk, mellyel 84 daganat specifikus fehérje egyidejű kimutatása lehetséges. A kiértékelést az ImageJ Lab 1.51 szoftver (1.51a, NIH, Bethesda, Maryland, USA) segítségével végeztük.

A fehérje - fehérje interakciók elemzéséhez a STRING 11.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) szoftvert használtuk (<http://string-db.org>).

Statisztikai elemzések

Az eredmények kiértékelését SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program segítségével végeztük. A Fisher-féle egzakt és a Mann-Whitney-Wilcoxon-teszteket alkalmaztuk az *OPN*-expressziós szintek és a primer melanómák és a melanoma-sejtvonalak klinikopatológiai adatainak

összehasonlítására. A túlélési analízist Cox-regressziós teszttel végeztük. Logisztikus regressziót alkalmaztunk a prognosztikai tényezők és az áttétképződés közötti összefüggés elemzésére. A Kruskal-Wallis-tesztet használtuk a melanoma alcsoportokban az *OPN* génexpresszió közötti szignifikáns különbségek meghatározására. A transzfekciós adatok statisztikai elemzéséhez Student's t-tesztet végeztünk. Minden esetben a $p \leq 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

***OPN* mRNS expresszió primer melanomákban**

Összesen 28 primer melanoma esetében volt lehetőség az *OPN* mRNS expresszió vizsgálatára. A kontrollhoz képest több, mint kétszeres expresszióbeli növekedést az esetek 93%-ában (26/28) mutattunk ki. Meghatároztuk a génkifejeződés és a klinikopatológiai paraméterek közötti kapcsolatot. Szignifikánsan magasabb *OPN* mRNS expressziót figyeltünk meg a vastagabb (4,00 mm-nél nagyobb) és kifeléyesedő felszínű melanomákban; továbbá az *OPN* expresszió főként a késői stádiumú daganatokban volt jelen (Clark IV. és V. szint).

Tizennégy primer melanoma esetében volt lehetőségünk az *OPN* gén mRNS és fehérje expressziós szintjeinek összehasonlítására. A primer melanoma minták többségében megnövekedett *OPN* mRNS expressziós szinteket mutattunk ki, melyekhez különböző mértékű fehérje expresszió társult. Az *OPN* fehérje és mRNS szintje között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

OPN fehérje expresszió és a primer melanomák klinikopatológiai paramétereinek közötti összefüggések

93 primer melanomában vizsgáltuk az OPN fehérje kifejeződését. A kiértékelés során a melanoma minták 87%-a (81/93) bizonyult pozitívnak. A rossz prognózisú (noduláris altípus, előrehaladott stádium, >4,01 mm vastagság, fekélyes felszín, áttétképződés és <5 éves túlélés) primer melanomák 71%-a nagy arányban expresszálta a fehérjét. Az OPN fehérje kifejeződés mértéke szignifikáns összefüggést mutatott a tumorok Breslow vastagságával és az áttétképzéssel. Vizsgáltuk az OPN fehérje expresszió intenzitásának mértékét is és azt találtuk, hogy a rossz prognózisú melanoma minták erősebb OPN festődést mutattak. Az OPN fehérjét kifejező daganat sejtek százalékos aránya továbbá a fehérje intenzitásának mértéke és a klinikai paraméterek kapcsolata közötti megfigyeléseink szerint a rossz prognózisú melanomák nagyobb arányban és markánsabban expresszálták az oszteopontint. Statisztikailag szignifikáns változást a daganatok Breslow vastagsága és a pozitív sejtek aránya, továbbá azok intenzitása között mutattunk ki.

A többváltozós logisztikus regressziós elemzésünk szerint az OPN-t expresszáló melanomák 1,39-szer nagyobb eséllyel okoznak metasztázis képződést, bár ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak. Míg a Breslow vastagság és az ulceráció esetében szignifikáns összefüggést találtunk az áttétképződéssel. Többváltozós Cox-regressziós elemzéssel vizsgáltuk az OPN expressziós szintje, a különböző prognosztikai tényezők és a túlélés közötti összefüggést. Eredményeink alapján a magas OPN

expresszió, a Breslow vastagság és a metasztatizáló hajlam szignifikánsan összefügg a melanomás betegek csökkent túlélésével.

***OPN* mRNS expresszió melanomában**

A melanoma progressziójával összefüggő mRNS expressziós változások azonosítása érdekében *in vitro* valós idejű kvantitatív PCR-t végeztünk primer melanomákból (n=12) és melanoma-metasztázisokból (n=8) származó sejtvonalakon. Az *OPN* gén expressziós mintázatának összehasonlításakor azt találtuk, hogy a relatív *OPN* mRNS expresszió szignifikánsan magasabb a metasztatikus potenciállal rendelkező sejtvonalakban. Célunk volt továbbá a sejtvonalak BRAF és NRAS mutációs státuszával összefüggő relatív oszteopontin expresszió összehasonlítása. A BRAF^{V600E} mutáció általános gyakorisága 70% volt, az NRAS mutációk kisebb (20%) gyakorisággal fordultak elő, mint a BRAF mutációk, és egyetlen sejtvonal sem volt egyszerre BRAF és NRAS mutáns. Az mRNS expressziós eredményeink szerint a BRAF^{V600E} mutációval rendelkező sejtvonalak (n=14) szignifikánsan magasabb mRNS expressziót mutattak, mint a vad típusú BRAF-mutációval rendelkező sejtvonalak.

Elemeztük a primer és metasztatikus tumorszövetekben az *OPN* mRNS szintjét is. Adataink szignifikáns különbségeket mutattak a melanoma alcsoportok között. A legmagasabb *OPN* gén expressziót a melanoma metasztázisokban találtuk (84,5). A 12 metasztatikus minta közül 8 esetében 13,1-84,5 közötti tartományt mutattunk ki. Az agresszív, noduláris altípusok csoportjában (n=10) három primer tumor szintén magas expressziót mutatott (17,6-61,8), míg a kevésbé agresszív, felszínesen terjedő altípusok (n=24)

mintái egységesebb mintázatot mutattak, alacsony *OPN* mRNS expresszióval (0,1-9,14 közötti tartomány).

OPN expresszió és az NF- κ B p65 fehérjeszint melanoma sejtvonalakban

Célunk volt az *OPN* és az NF- κ B p65 fehérje szubcelluláris eloszlásának azonosítása. A metasztatikus potenciállal nem rendelkező, primer tumor korai elváltozásából származó sejtvonalban az *OPN* és az NF- κ B p65 fehérje expresszióját a citoplazmában figyeltük meg. Míg az áttétképző hajlammal rendelkező, tumorigén primer melanoma sejtvonalban, mind az *OPN*, mind az NF- κ B p65 fehérje expresszióját a citoplazmában és a sejtmagban is egyaránt megfigyeltük.

Az RNSi hatása az *OPN* expresszióra

A transzfekciós vizsgálatainkhoz egy primer és egy metasztatikus sejtvonalpárt (WM278 - WM1617) választottunk, amelyek ugyanabból a beteg primer tumorából és metasztázisából származnak. Mindkét sejtvonal BRAF^{V600E} mutációval rendelkezett és vad típusú volt a RAS gén tekintetében. A magas *OPN* expressziójú melanoma sejtvonalakban *OPN*-specifikus siRNS segítségével hatékonyan gátoltuk az *OPN* expresszióját. A génextpresszió szignifikáns csökkenését figyeltük meg a primer és a metasztázis eredetű sejtvonalban is. Továbbá megfigyeltük, hogy a transzfektált sejtek proliferációja is jelentősen csökkent a negatív kontrollal kezelt és a kezeletlen sejtekhez képest.

Az RNSi hatása a melanoma sejtek inváziós képességére

A transzfektált sejtvonalak invazív potenciáljának vizsgálatához Matrigel-inváziós kamrákat használtunk. Az invázió szignifikáns csökkenését figyeltük meg az OPN csendesített sejtekben a kontroll sejtekhez képest. Eredményeink alapján a csökkent *OPN* expresszió a sejtek csökkent inváziós képességével társult.

A kezeletlen és transzfektált sejtek fehérje expressziójának elemzése

A kezeletlen és a transzfektált sejtvonalak közötti fehérje expressziós különbségek meghatározásához Proteome Profiler Human XL Onkológiai array-t használtunk, mely 84 daganatos elváltozással kapcsolatos fehérje expressziójának egyidejű detektálására ad lehetőséget. A kezeletlen sejtvonalakban számos eltérő mértékben expresszálódó fehérjét figyeltünk meg a transzfektált sejtekhez képest. A fehérje mintázatok elemzésekor az OPN mellett öt fehérje eltérő expresszióját találtuk mindkét transzfektált sejtvonalban. Az OPN, az EGFR, a Tenascin C és a Survivin nevű fehérjéket szignifikánsan csökkent expresszió jellemezte. A Galektin -3 és az Enoláz 2 szignifikánsan csökkent expressziót mutatott a transzfektált WM278 primer tumorból származó sejtvonalban, ezzel szemben e két fehérje expressziója megnövekedett az OPN siRNS-el kezelt, metasztázisból származó WM1617 sejtekben.

A fehérje interakciós elemzésünk szerint a sejtvonalakban megfigyelt fehérjék több csoportot alkottak, melyek meghatározó szerepet töltenek be a melanoma progresszió során. Ezek a következők: extracelluláris mátrix

szerveződés, az angiogenezis, a sejthalál és a sejtmigráció szabályozása, valamint a PI3K-Akt, MAPK és a fokális adhézió jelátviteli útvonalak.

DISZKUSSZIÓ

Emelt szintű oszteopontin expressziót több tumor típusban, többek között malignus melanómában is leírtak. Irodalmi adatok alátámasztják az OPN szerepét a tumorigenezis, a daganat invázió és progresszió folyamatában. Emelkedett szintje a legújabb vizsgálatok értelmében szoros összefüggést mutat a metasztatikus potenciállal, ezért ígéretes biomarkernek tartják.

A vizsgálataink fő célja az volt, hogy jobban megértsük az OPN expresszió molekuláris mechanizmusát a melanoma progressziója során. A melanoma progressziójában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok tanulmányozása kulcsfontosságú betekintést nyújthat a betegség diagnózisába és kezelésébe. E mechanizmusok megértése olyan célzott terápiák kifejlesztéséhez vezethet, amelyek specifikusan gátolják vagy modulálják az OPN-t és ezáltal potenciálisan lassítják vagy megakadályozzák a melanoma áttétképződését.

Előzetes génextpressziós microarray vizsgálataink során a rossz prognózissal jellemezhető primer melanomák csoportjában a legmagasabb mRNS expressziós szintet az oszteopontinnál figyeltük meg. Tanulmányunk egyik célja a korábbi microarray eredmények validálása volt melanoma tumor mintákon. Eredményeink szerint az emelkedett *OPN* mRNS szint szignifikánsan összefügg a késői stádiumú, kifeléyesdő felszínű és vastagabb melanomákkal. Vizsgáltuk a fehérje kifejeződés mértékét szöveti multiblokk rendszerben is és megállapítottuk, hogy a rosszabb prognózisú

minták nagyobb arányban és erősebb intenzitással expresszálják az oszteopontint. A fehérje- és génexpressziós eredményeink nem mutattak egyértelmű összefüggést minden mintában. Átlagosan azt figyeltük meg, hogy az *OPN* mRNS magas szintje erős antigénpozitivitással társult. Az ellentmondások egyik oka lehet, hogy viszonylag korlátozott számú melanoma minta állt rendelkezésünkre. Ezen kívül az egyes mRNS-molekulák és fehérjék közötti kölcsönhatások is eltérhetnek, ami a korreláció eltérését eredményezi. Melanomában a betegség nagyfokú heterogenitása, a jelátviteli utakban történt eltérések és egyes epigenetikai változások szintén befolyásolhatják az mRNS- és fehérjeszintek közötti különbséget.

Célunk volt továbbá a megvizsgálni az *OPN* expresszió és a klinikai paraméterek áttétképződésre gyakorolt hatását. Azt találtuk, hogy a vastagabb, kifehélyesedő felszínű és *OPN*-t expresszáló melanomákban nagyobb az áttét kialakulásának esélye. Továbbá vizsgálva az *OPN* expresszió, a klinikai paraméterek és a túlélés közötti kapcsolatot azt találtuk, hogy a magas *OPN* expressziót mutató, vastagabb és áttétet képző melanomáknál szignifikánsan nagyobb a valószínűsége a halálozásnak.

Korábbi tanulmányok szerint az *OPN* integrin receptorokhoz ($\alpha v \beta 3$) kötődve, aktiválja a nukleáris-faktor-kappa- β ($\text{NF}\kappa\beta$) útvonal foszforilációs kaskádját. Az $\text{NF}\kappa\beta$ -komplex alegységei (p50 és p65) felszabadulnak a gátlás alól és nukleáris transzlokációt követően elősegítik a sejtek proliferációját, túlélését, a daganat növekedését és a metasztázis kialakulását. Immunhisztokémia segítségével megfigyeltük az $\text{NF}\kappa\beta$ p65 fehérje nukleáris transzlokációját egy magas *OPN* mRNS expressziót mutató melanoma sejtvonalba (WM278), amely az *OPN* által indukált $\text{NF}\kappa\beta$

útvonal aktiválódásra utal. Az alacsony OPN expresszióval jellemezhető melanoma sejtvonalak nem mutattak NF- κ B p65 nukleáris lokalizációt. Ez az eredmény erősen alátámasztja azt a hipotézist, hogy az OPN integrinkötő doménje döntő fontosságú a melanoma sejtek metasztázis képzésében.

Az elmúlt évtizedben az RNS interferencia (RNSi), amely a génexpresszió gátlásának poszt-transzkripciós mechanizmusa, ígéretes eredményeket mutatott a különböző daganat típusok molekuláris génterápiájában. Ezért célunk volt az OPN-t kifejező sejtvonalakban a gén csendesítése RNS interferencia segítségével, valamint a csendesített sejtvonal (WM278) invazív tulajdonságának vizsgálata Matrigel inváziós assay használatával. Az OPN specifikus siRNS általi géncsökkentés következtében az OPN expressziójának mRNS szinten történő csökkenését tapasztaltuk. A gén hatékony gátlását követően, a transzfektált sejtvonal invazív képességének csökkenését figyeltük meg az eredeti sejtvonalhoz képest.

Proteome Profiler Human XL Oncology Array alkalmazásával vizsgáltuk a kezeletlen és transzfektált sejtvonalak fehérje expressziós különbségeit. A proteome array 84 daganatspecifikus fehérjéje közül számos, eltérő expressziójú fehérjét találtunk a vizsgált sejtvonalak között. Az OPN fehérje expressziós szintje csökkent mindkét transzfektált sejtvonalban (primer tumor és metasztázis eredetű sejtvonal). Az OPN mellett öt fehérje (EGFR, Tenascin C, Survivin, Galektin-3 és az Enoláz 2) expressziója változott a kezelt sejtvonalakban. Korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan az OPN és egy antiapoptotikus fehérje, a Survivin expressziójának jelentős csökkenését tapasztaltuk, melyek a BRAF-gátló rezisztenciával állhatnak kapcsolatban. A transzfektált sejtvonalakban a Tenascin C és a Survivin fehérje

expressziójának csökkenése összhangban volt az OPN expressziós szintjének változásával. Ezen fehérjék fontos szerepet játszanak a különböző metasztázishoz kapcsolódó mechanizmusokban, beleértve a sejtproliferációt, apoptózist, inváziót és migrációt. A Tenascin C expressziója bizonyítottan alapvető fontosságú a sejtek inváziójában és migrációjában és fontos a metasztázis kialakulása során. A legújabb tanulmányok szerint az OPN és az EGFR expressziója között jelentős összefüggés van a világos sejtveserákban. A mi eredményeinkhez hasonlóan az OPN gátlása csökkent EGFR expresszióhoz és fokozott apoptotikus sejthalálhoz vezetett. Az apoptózis jelentősen fokozódott az OPN knockout egerekben és az EGFR downregulációjával járt együtt. Továbbá azt találtuk, hogy a csökkent OPN expresszió alacsonyabb Galektin-3 és Enoláz 2 fehérjeszintekkel járt együtt a primer tumorból származó transzfektált sejtvonalban; azonban e fehérjék expressziója az OPN csendesítését követően megnövekedett a metasztatikus sejtvonalban. A Galektin-3 expresszió számos tumorban a progresszió és az áttétképződés markere és elősegítője. Legújabb tanulmányok szerint az OPN és a Galektin-3 a személyre szabott öregedésgátló terápia potenciális célpontja lehet. A kezelt metasztatikus sejtvonalban Galektin-3 és Enoláz 2 overexpressziót mutattunk ki és feltételezzük, hogy mindkettő kiemelkedő szerepet játszik a melanoma sejtek agresszív fenotípusának kialakulásában. A két fehérje egyidejű expresszióját és a melanoma progresszióban betöltött szerepét korábban még nem írták le az irodalomban. Az elemzéseink során azt találtuk, hogy az OPN specifikus siRNS-sel kezelt sejtekben a megváltozott expressziójú fehérjék az extracelluláris mátrix

kötődésének folyamatában (Galektin-3 és OPN) és a fehérje dimerizációban vehetnek részt (EGFR, Galektin-3, Enoláz 2 és Survivin). A tanulmányozott fehérjék downregulációja csökkent migrációval, invázióval és csökkent daganatnövekedéssel járt együtt korábbi vizsgálatokban. A Galektin-3 fehérje szabályozó szerepét is leírták a daganat őssejtekkel kapcsolatos útvonalakban, többek között az EGFR/FGFR útvonalban is, valamint az OPN által indukált migrációt és inváziót is összefüggésbe hozták a különböző EGF-receptorok aktiválódásával. Mindezek alapján az OPN és a többi vizsgált fehérje csökkent szintje a kevésbé agresszív fenotípus kialakulását segítheti elő. Az EGFR, OPN és Tenaszcin C fehérjék a PI3K-Akt jelátviteli útvonalhoz köthetők, míg az EGFR, a Galektin-3 és az OPN fehérjék a RAF/MEK/ERK útvonallal hozhatók összefüggésbe, de bizonyítottan mindkét útvonal alapvető fontosságú a melanoma tumorigenezisében. Az EGFR, az OPN és a Tenaszcin C fontos szerepet játszik a fokális adhézió jelátviteli útvonalban. A transzfekeció során a fehérjék elősegítik az extracelluláris mátrix és a citoszkeleton közötti kapcsolatot, valamint funkcionálisan szabályozzák a sejtproliferációt, a differenciálódást és a motilitást. Ezen jelátviteli útvonalak változásai jelentős szerepet játszanak a melanoma patogenezisében, mivel befolyásolják a tumorigenezist, a sejtek növekedését, a kemorezisztenciát, az inváziót és a migrációt.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy a daganatok OPN expressziója a rossz prognózis erős előrejelzője. Elemzéseink megerősítették, hogy az OPN szignifikáns prediktora a melanomás betegek túlélésének. Továbbá kimutattuk, hogy az OPN magas expressziós szintje a melanoma

agresszívebb fenotípusával jár együtt. Ez a tanulmány az első, amely kimutatta a fehérje expressziós különbségeket a kezeletlen és az OPN-siRNS-el transzfektált melanoma sejtvonalak között. Eredményeink arra utalnak, hogy az OPN gén csendesítése hatással lehet a melanoma sejtek proliferációjára és inváziójára az EGFR, Tenascin C, Survivin, Galektin-3 és Enoláz 2 expressziójának befolyásolásával.

Végezetül, az NF- κ B p65 fehérje nukleáris transzlokációját figyeltük meg egy magas *OPN* mRNS expressziójú melanoma sejtvonalban, ami az OPN által indukált NF- κ B út vonal aktiválódására utal. Az OPN expresszióját specifikus siRNS segítségével gátoltuk melanoma sejtvonalakban és ezt követően csökkent sejtproliferációt és inváziót tapasztaltunk. Eredményeink arra utalnak, hogy az OPN overexpressziója fontos szerepet játszik a melanoma progressziójában és sikeresen gátolható melanoma sejtekben; ezért az OPN expresszió blokkolása ígéretes terápiás célpont lehet melanomában.

FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS EREDMÉNYEK

A doktori disszertáció fő célja az OPN expresszió szerepének mélyebb megértése volt a melanoma progressziója során.

Az OPN mRNS-szintű expressziójának vizsgálata a primer melanoma szövetek különböző altípusaiban és a melanoma metasztázisokban:

- Megnövekedett *OPN* mRNS szintet figyeltünk meg az előrehaladott stádiumú, kifehélyesedő felszínű és a vastagabb primer melanomákban.
- Az *OPN* mRNS szintjének szignifikáns növekedését tapasztaltuk a melanoma progressziója során.

Az OPN fehérje expressziójának elemzése primer melanomákban:

- Az OPN fehérje expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a Breslow vastagsággal és az áttétképződéssel.
- Kimutattuk, hogy az áttétképződés jellemzőbb a vastagabb primer melanomák esetében.
- Az OPN fokozott expressziója szignifikánsan összefüggést mutatott a melanomás betegek csökkent túlélésével.

Az OPN génexpressziós mintázatának meghatározása primer és metasztázis eredetű melanoma sejtvonalakban:

- A relatív *OPN* mRNS expresszió jelentősen magasabb a metasztatikus potenciállal rendelkező sejtvonalakban.
- Az *OPN* expresszió szignifikánsan magasabb volt a BRAF mutáns sejtekben, mint a BRAF vad típusú sejtekben.

Az RNSi hatása a magas OPN expressziójú melanoma sejtvonalakban:

- OPN specifikus siRNS segítségével sikeresen gátoltuk az *OPN* mRNS és fehérje expresszióját a kiválasztott melanoma sejtvonalakban.
- Megfigyeltük, hogy a transzfektált sejtek proliferációja és inváziós képessége is csökkent.

A kezeletlen és transzfektált sejtek fehérje expressziós elemzése:

- Tanulmányunk az első, amely kimutatta az OPN siRNS-el kezelt és kezeletlen melanoma sejtek fehérje expressziós különbségeit.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az OPN magas expressziós szintje a melanoma agresszívabb fenotípusával társul. Emellett eredményeink először mutatták ki, hogy az OPN gén csendesítése hatással van a melanoma sejtek proliferációjára és inváziójára az EGFR, a Tenascin C, a Survivin, a Galektin-3 és az Enoláz 2 fehérjék expressziójának befolyásolása által. Adataink rámutatnak, hogy az OPN alkalmas gyógyszerfejlesztési és terápiás célpont lehet melanomában.



Nyilvántartási szám: DEENK/17/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kiss Tímea
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10048422

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kiss, T.**, Jámbor, K., Koroknai, V., Szász, I., Bárdos, H., Mokánszki, A., Ádány, R., Balázs, M.:
Silencing Osteopontin Expression Inhibits Proliferation, Invasion and Induce Altered Protein
Expression in Melanoma Cells.
Pathol. Oncol. Res. 27, 1-10, 2021.
IF: 2.874
2. **Kiss, T.**, Ecsedi, S., Vízkeleti, L., Koroknai, V., Emri, G., Kovács, N., Ádány, R., Balázs, M.: The
role of osteopontin expression in melanoma progression.
Tumor Biol. 36 (10), 7841-7847, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3495-y>
IF: 2.926

További közlemények

3. Szász, I., **Kiss, T.**, Mokánszki, A., Koroknai, V., Deák, J., Patel, V., Jámbor, K., Ádány, R., Balázs,
M.: Identification of liquid biopsy-based mutations in colorectal cancer by targeted
sequencing assays.
Mol. Cell. Probes. 67, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101888>
IF: 3.285 (2021)
4. Jámbor, K., Koroknai, V., **Kiss, T.**, Szász, I., Pikó, P., Balázs, M.: Gene Expression Patterns of
Osteopontin Isoforms and Integrins in Malignant Melanoma.
Pathol. Oncol. Res. 28, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2022.1610608>
IF: 2.874 (2021)





5. Szász, I., Koroknai, V., Patel, V., Hajdú, T., **Kiss, T.**, Ádány, R., Balázs, M.: Cell Proliferation Is Strongly Associated with the Treatment Conditions of an ER Stress Inducer New Anti-Melanoma Drug in Melanoma Cell Lines.
Biomedicines. 9 (2), 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9020096>
IF: 4.757
6. Patel, V., Szász, I., Koroknai, V., **Kiss, T.**, Balázs, M.: Molecular Alterations Associated with Acquired Drug Resistance during Combined Treatment with Encorafenib and Binimetinib in Melanoma Cell Lines.
Cancers (Basel). 13 (23), 1-22, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13236058>
IF: 6.575
7. Szász, I., Koroknai, V., **Kiss, T.**, Vízkeleti, L., Ádány, R., Balázs, M.: Molecular alterations associated with acquired resistance to BRAFV600E targeted therapy in melanoma cells.
Melanoma Res. 29 (4), 390-400, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0000000000000588>
IF: 2.75
8. Vízkeleti, L., **Kiss, T.**, Koroknai, V., Ecsedi, S., Papp, O., Szász, I., Ádány, R., Balázs, M.: Altered integrin expression patterns revealed by microarray in human cutaneous melanoma.
Melanoma Res. 27 (3), 180-188, 2017.
IF: 3.135
9. Koroknai, V., Ecsedi, S., Vízkeleti, L., **Kiss, T.**, Szász, I., Lukács, A., Papp, O., Ádány, R., Balázs, M.: Genomic profiling of invasive melanoma cell lines by array comparative genomic hybridization.
Melanoma Res. 2, 100-107, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0000000000000227>
IF: 2.615
10. Ecsedi, S., Hernandez, V. H., Lima, S. C., Vízkeleti, L., Tóth, R., Lázár, V., Koroknai, V., **Kiss, T.**, Emri, G., Herceg, Z., Ádány, R., Balázs, M.: DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour.
PLoS One. 9 (5), e96612, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096612>
IF: 3.234





11. Vízkeleti, L., Ecsedi, S., Rákosy, Z., Orosz, A., Lázár, V., Emri, G., Koroknai, V., **Kiss, T.**, Ádány, R., Balázs, M.: The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma.

Tumor Biol. 33 (6), 2189-2199, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0480-6>

IF: 2.518

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,543

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,8**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.01.17.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki elsősorban témavezetőmnek, Dr. Balázs Margit egyetemi tanárnak mindazért a támogatásért és bölcsességért, mellyel doktori tanulmányaimat irányította.

Köszönettel tartozom Dr. Ádány Róza egyetemi tanárnak, hogy tanulmányaimat az Általános Orvostudományi Kar Népegészség- és Járványtani Intézetben lehetővé tette.

Köszönettel tartozom Koroknai Viktóriának és Szász Istvánnak a kísérletek, elemzések során nyújtott kiemelkedő segítségéért és barátságukért.

Köszönöm a támogatását intézet valamennyi munkatársának, különösképpen Kovács Györgyné Mariannak.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak a támogatásért és türelemért, amit felém tanúsítottak doktori tanulmányaim során.

Munkámat támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K112327), TÁMOP-4.2.2/B-10/1-20100024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031, valamint GINOP-2.3.2-15-2016-00005 projektek és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. A munka az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.