

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A NOTCH-1 RECEPTOR AKTIVÁCIÓ HATÁSÁNAK ÉS
MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA PRIMER MELANOMÁK
PROGRESSZIÓJÁBAN IN VITRO ÉS SCID EGÉR MODELLEN**

DR. BÁLINT KLÁRA
általános orvos

Témavezető: Dr. Juhász István
Egyetemi docens

Készült a Debreceni Egyetem
Klinikai orvostudományok doktori iskolájában

Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum
Bőrgyógyászati Klinika
Debrecen, 2009

1. Bevezetés, célkitűzés

A halálozási statisztikákban a rosszindulatú megbetegedések szerepelnek a második helyen a szív- és érrendszeri megbetegedések után. A melanoma malignum - a bőr pigmenttermelő sejtjeiből kiinduló rosszindulatú daganat - incidenciája növekszik világszerte, és ez a növekedés becslések szerint 15 évenként megduplázódik. A melanoma malignum korai felismerésével és az időben elvégzett sebészeti kezeléssel a betegek eredményesen gyógyíthatók, azonban metasztázis kialakulása esetén a betegség rövid idő alatt halálhoz vezethet. A melanoma sejtek ellenállnak a radio- és kemoterápiának, valamint rezisztensek a programozott sejthalálra.

A tumorok kialakulása, illetve progressziója egy komplex, több lépcsős (genetikai változások és környezeti hatások révén létrejövő) folyamat, amely során számos molekuláris eltérés kialakulása szükséges a malignitás eléréséhez. Számos kutatócsoport tanulmányozza a melanoma sejtek növekedését különböző *in vitro* és *in vivo* modelleken, de az ezzel kapcsolatos ismereteink a mai napig nem teljeseek.

Az elmúlt évtizedekben felfedezett Notch receptorcsaládot eddig kevésbé tanulmányozták. A Notch receptorok az embrionális fejlődés szabályozásában résztvevő transzmembrán fehérjék, amelyekről kiderült, hogy jelentős szereppel bírnak a rosszindulatú megbetegedések kialakulásában is. A T-sejtes leukémiás esetek jelentős részében a Notch-1 receptor (transzlokáció révén kialakult) permanens aktiválódása a T-limfociták kontrollálatlan növekedését okozza. 2000 körül jelentek meg az első olyan tudományos közlemények, amelyek a Notch-1 receptorokat szolid tumorok kialakulásával (tüdő, cervix, vese eredetű daganatok) hozták összefüggésbe. A Notch-1 receptor jelentősége a melanoma malignum kialakulásában, progressziójában, illetve a metasztázis kialakulásában nem ismert. Munkánk célja az volt, hogy *in vitro* humán sejt kultúra modellen, és *in vivo* SCID egér modellen tanulmányozzuk a Notch-1 receptor szerepét a tumornövekedésben, és tüdőmetasztázis-képzésben. Kísérleteinkkel szerettünk volna hozzájárulni a melanoma patogenezisének részletesebb

megismeréséhez. Ezen megfontolásból az alábbi kísérleti stratégiát állítottuk fel:

1. A funkcionálisan aktív Notch-1 receptorok expressziójának vizsgálata humán melanocita és melanoma sejtvonalakon, illetve humán naevus pigmentosus és melanoma malignum szövetmintákon.
2. A Notch-1 receptor gátlása, és a gátlás utáni hatás tanulmányozása a melanoma sejtek növekedésére *in vitro* és *in vivo*.
3. A funkcionálisan aktív Notch-1 receptor emlős expresszióra alkalmas vektor konstrukcjainak, és rekombináns lentivirális konstrukciónak előállítás. A Notch-1 aktív formájának nagymértékű expresszálása emberi eredetű melanoma sejtvonalakon.
4. A Notch-1 normálisnál nagyobb mértékű expressziója (overexpresszió) általi hatás vizsgálata a melanoma sejtek növekedésére (*in vitro* & *in vivo* SCID egér modellen).
5. A Notch-1 overexpresszió hatásának tanulmányozása a sejtadhézióra, és egyes adhéziós molekulák expressziójára.
6. A Notch-1 overexpresszió hatásának tanulmányozása a β -katenin fehérje (mint lehetséges „downstream” target molekula) melanoma sejtekben mért szintjére.
7. A β -katenin molekula expressziójának gátlása (RNS interferencia, siRNS alkalmazásával), és a sejtproliferációra, apoptózisra és tumorgenezisre kifejtett hatás tanulmányozása a permanensen aktív Notch-1 receptorral rendelkező melanoma sejtekben.

2. Irodalom

2.1. *Melanoma malignum*

A betegség incidenciája Magyarországon 7.6/100,000, a betegség okozta halálozás pedig 1.6/100.000. (WHO, 2000) A Debreceni Egyetem

Orvos és Egészségtudományi Centruma Bőr- és Nemikórtani Klinikáján az új melanomás esetek száma 1999 és 2006 között 80 és 118 között változott. A bőr eredetű melanomák szövettanilag 4 nagy csoportba oszthatók. A felszínesen terjedő vagy superficial spreading melanoma (SSM) az összes melanomák kétharmadát adják. A nodularis melanomák, a vertikális növekedési fázisú tumorok az esetek 10-15%-át alkotják. A lentigo maligna melanoma (LMM), -in situ formája a lentigo maligna- napfénynek kitett bőrfelületen jelentkezik. Az acralis lentiginosus melanoma (ALM) tenyéren, talpon és subungualis lokalizációban fordul elő. A primer melanomák leghasznosabb prognosztikai indikátorának a *Breslow* féle tumor vastagság értékét, és az ulceráció meglétét vagy hiányát tartják. A melanoma malignum kiemelkedő áttétképzési tulajdonságokkal rendelkezik, az áttétek kb. 2/3-a a primer tumor felismerését követő első 3 évben kialakul.

A melanoma kialakulása egy több lépcsős biológiai folyamat. A Clark által kidolgozott modell szerint a melanoma leggyakrabban a naevus talaján fejlődik ki, majd a radiális növekedési fázist és a vertikális növekedési fázist követően metasztázisok kialakulása jöhet létre. A malignus sejtekre jellemző leglényegesebb eltérések a következőkben foglalhatók össze: korlátlan osztódási aktivitás, a programozott sejthalálra való érzékenység elvesztése, a szöveti invázió és metasztázis képzésének képessége, a sejtnövekedést kontroll alatt tartó szignálokra való inszenzitivitás, az angiogenezis serkentésének képessége, valamint a sejt saját növekedését fokozó mechanizmusainak bekapcsolása. A melanoma kialakulásában és progressziójában az eddig felderített és fontos szerepet játszó molekuláris változások a következő géneket érintik: a Mitogen-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal, RAS, BRAF, retinoblastoma útvonal, p53 útvonal, sejtciklus, PI3Kináz útvonal, MITF, c-KIT.

2.2 Notch-1 receptor

A Notch gén egy szabályozó jelrendszert működtet az élő szervezetben, és ezen jelátviteli útvonal egyes elemek szerkezete a törzsfajlás során alig változott. Az emlősökben négy különböző típusú

Notch-receptor található meg: a Notch-1-2-3-4 receptor. Ezek - mechanizmusukat tekintve - az I-es típusú sejtfelszíni receptorok közé tartoznak. Egy, a ligand kötődésére szolgáló, nagyméretű extracelluláris doménnel, egy transzmembrán doménnel, valamint egy a szignáltranszdukcióban közvetlenül is részt vevő intracelluláris doménnel rendelkeznek. A Notch receptorok egyetlen fehérjéből álló prekursor molekulaként termelődnek, ami egy 3 lépéses aktiválódási folyamaton megy keresztül. Metalloproteázok, mint pl. TACE (ADAM17), illetve γ -szekretázok (presenilin) hasítása révén felszabadul a Notch intracelluláris doménja (NIC), amely bejut a sejtmagba, ahol CSL transzkripciós faktorhoz kapcsolódva különböző gének transzkripcióját indítja be. A Notch receptorok által szabályozott legismertebb gének: a bázikus helix-loop-helix (bHLH) hairy/enhancer od split (Hes) géncsalád tagjai, p21, cyclin-D1, myc, PTEN, EphrinB2; a Notch receptorral kapcsolatos gének közül a Nrarp, a Deltex-1, valamint a pre-T cell receptor- α gén, illetve simaizom aktin ismert. A humán Notch receptoroknak 5 ligandja ismert: a Delta-1, Delta-3, Delta-4, Jagged-1 és a Jagged-2. A ligandok is az I-es típusú transzmembrán receptorok közé tartoznak. A Notch szignalizációs útvonal főleg poszttranszláció úton szabályozódik, a receptor és a ligand extracelluláris doménjének glikozilációján, vagy proteolízisén keresztül.

A Notch jelátvivő rendszer fiziológiás szerepe a többsejtes eukarióta élőlények *egyedfejlődésének*, és a már kifejlett egyedek *szöveti homeosztázisa fenntartásának* koordinálása, és működése mind a három csíralemezből (endo-, mezo-, ektoderma) kiinduló szövettípusokat érinti. Kiderült, hogy a Notch jelátvivőrendszer kóros működése onkogénként hozzájárul az emlőrák, vastagbélrák, a korai stádiumú méhnyakrák, a hasnyálmirigyrák, valamint egyes agydaganatok kialakulásához. Néhány daganattípusban, mint pl a keratinocita eredetű daganatok (bazalioma, spinalioma), egyes B-sejt eredetű daganatok (B-ALL), késői stádiumú méhnyakrák, hepatocellularis carcinoma és pajzsmirigyrák esetében viszont tumorszuppresszorként viselkedik. A Notch-1 gén celluláris *proto-onkogénnel* együttműködve képes felgyorsítani a tumorképződés folyamatát különböző

szövetekben. A jelenlegi magyarázat szerint a Notch receptorok működésének jellege nagyban függ a receptor típusától, a jel erősségétől, az időzítéstől, a sejtípustól és a szövettípustól.

2.3 Az *adhéziós molekulák szerepe*

A tumormetasztázis kialakulásához számos szekvenciális lépés szükséges: a tumorsejteknek disszociálódniuk kell a primer tumortól, majd infiltrálniuk kell a környező strómát, az érfalat, illetve a nyirokutakat, továbbá ki kell lépniük az érrendszerből, és sikeresen behatolni és megtelepedni a célszervben. Hogy ezek a sejtek elpusztulnak, csendben túlélnek, avagy klinikailag diagnosztizálható tumort hoznak-e létre, az nagyban függ az immunrendszertől és a mikrokörnyezet hatásától is. A sejt-sejt, illetve a sejt-extracelluláris matrix kapcsolódást lehetővé tevő sejt-adhéziós molekulák (kadherineket, integrineket, szelektineket és az immunglobulin család tagjai) fontos szerepet játszanak a fenti lépésekben, így a metasztázis kialakulásában is.

Amikor a melanociták malignus melanomasejtté transzformálódnak, illetve, amikor a tumorsejtek a noninvazív radiális fázisból az invazív, metasztatikus potenciállal bíró vertikális fázisba lépnek át, akkor a sejt-felső adhéziós fehérjék repertoárja lényegesen megváltozik. Ismeretes, hogy a leglényegesebb változások az E- és N-kadherin (Ca²⁺ függő sejtadhéziós molekulák), Mel-CAM és az $\alpha\beta 3$ integrin (vitronectin receptor) molekulákat érintik. A Mel-CAM fehérje a melanoma metasztázisok 80%-ban megtalálható, és a szintje egyenesen arányos a Breslow értékkel. A Mel-CAM megjelenése a melanoma sejteken fokozza azok aggresszióját, és metasztatikus potenciálját. Ha korai, radiális fázisú melanoma sejtekben a Mel-CAM molekula expresszióját indukálják, majd ezeket a sejteket egerekbe oltják, akkor az esetek 70%-ban metasztázis alakul ki.

Egyre több tény támasztja alá a feltevést, hogy tumor sejtek képesek szabályozni a saját adhéziójukat az intracelluláris térből kiinduló jelekkel, az integrineken keresztül. Mechanikai hatást (nyomás, súrlódás, deformáció) követően a citoskeleton mechanikai szenzorainak, mint pl Src, PI3-kinázok,

fokális adhéziós kinázok (FAK) és Akt-1 működésében változás következik be.

2.4 Beta-katenin

Nicolas és mtsai 2003-ban (Nature Genetics) hívták fel a figyelmet a Notch-1 receptor és a β -katenin fehérjék kapcsolatára. A β -katenin egy 92-97kDa méretű fehérje, amely az, α -, γ - és δ -katenin molekulákkal együtt (plakoglobinok) az E-kadherin receptor intracelluláris régiójához kötődik, a zonula adherens része. A β -katenin a sejten belül több, különböző kompartmentben is megtalálható. A membránhoz asszociált β -kateninek az adhézióban, míg a citoplazmában található β -kateninek a szignáltranszdukcióban vesznek részt. A wingless (WNT) jelátviteli rendszer tagjai transzkripciós faktorként résztvesznek a test részarányosságának, és szelvényezettségének szabályozásában. A WNT útvonal a három legfontosabb, az embrionális fejlődést szabályozó rendszerek (Wingless/WNT, Sonic-Hedgehog és Notch) egyike.

3. Anyagok és módszerek

Sejttenyésztés: A humán melanoma sejtvonalakat (WM35, WM115, WM278, WM3248, WM239A and 1205Lu) humán melanomából, és a FOM104, Fom105 és Fom117 humán melanocita sejtvonalakat emberi epidermisből izoláltuk és tenyésztettük.

Sejtadhézió vizsgálata: A melanoma sejtek adhézióját a következők szerint vizsgáltuk: 24-lyukú lemezbe melanoma sejteket szélesztettünk, majd 30 perces inkubáció után (37°C) a letapadt sejteket megszámloltuk. A homotípusos sejtadhézió vizsgálata céljából melanoma sejteket agarral borított 96-lyukú lemezbe tettük, majd 48 órán keresztül inkubáltuk. Az agar borítás révén a sejtek mindvégig non adherens állapotban maradtak.

Három-dimenziós szferoidok növekedésének vizsgálata agarban: A szferoidok a „liquid overlay” módszerrel készültek: melanoma sejtet helyeztünk agarral borított 96-lukú lemezbe. A lemezeket 48 órán át

inkubáltuk, a szferoidokat begyűjtöttük, majd I-es típusú borjú kollagén gélbe ágyasztuk be. 72-96 óra elteltével LIVE/DEAD Viability kit-tel megfestettük, majd lefényképeztük.

A Notch-1 receptor és az adhéziós molekulák kimutatása: A fehérjemolekulák kimutatása Western (immuno) blotlaltal és immunhisztokémiával történt. A 15 naevus pigmentosus, és 15 melanoma malignum diagnózisú esetből származó szövettani metszetek a Debreceni Egyetem Orvosi és Egészségtudományi Centrumának Bőrklínikájáról származtak. A paraffinba ágyazott mintákból származó metszeteket peroxidáz módszer alkalmazásával festettük meg. Az enzimaktivitást AEC kromogénnel detektáltuk.

Real-time PCR és szemikvantitatív PCR: A melanoma és melanocita sejtekből Trizol módszerrel RNS-t izoláltunk, abból cDNS-t szintetizáltunk, majd real-time PCR reakciót végeztünk. Minden minta és standard minta eredménye háromszori mérés átlaga. Az eredmények meghatározásához standard görbét készítettünk a threshold cycle (Ct) értékek figyelembevételével. A mintákat a β -aktin szint révén normalizáltuk.

Sejtnövekedés és apoptózis mérése: A sejtnövekedést MTT módszerrel vagy pedig $^3\text{[H]}$ timidin beépülés meghatározásával mértük. Az apoptózist az egyes szálú DNS mennyiségének meghatározásával mértük.

Kolónianövekedés agarban (soft agar colony formation assay): Melanoma sejteket FBS-t is tartalmazó agar gélbe keverve 6-well lemezbe helyeztük. A vályúk felszínét a sejtek behelyezése előtt agarral fedtük be a műanyag felszínnel való érintkezés elkerülésére. Minden mintából triplikátumot készítettünk. A sejtkolóniákat 10 nap inkubálás után megszámoltuk, majd a mintákat lefényképeztük.

Rekombináns retro- és lentivírusok létrehozása: Génbevitel céljából különböző virális vektorokat hoztuk létre. A zöld fluorescens fehérje (GFP)-lentivírust és egy NIC-GFP/lenti vírust készítettünk a NIC gén szakaszának a

pIRES2-EGFP plazmidba való beillesztésével. Ebből a GFP-t tartalmazó gént utólag eltávolítottuk, majd H1UG-ba, az FG12-es lentivírusból vektorból származtatható vektorba illesztettük be. Minden egyes létrehozott plazmid esetében a helyes szerkezetről restriktációs enzimes hasítással, illetve DNS szekvenálással bizonyosodtunk meg. A pseudotípusos lentivírusokat 293T sejtekben növesztettük fel. A vírus titerét NIH/3T3 sejtek transzdukciójának mértéke segítségével határoztuk meg. A zölden fluoreszkáló, sikeresen megfertőzött sejteket mikroszkóp alatt megszámoltuk. A MAML1/pBabe, DN MAML1/pBabe és az üres pBabe (mock) retrovírus vektor szerkezetét lásd korábbi publikációkban. A rekombináns retrovírusok létrehozása során a vektort Phoenix (AMPHO) retrovírus-szaporító sejtekbe jutattuk be szintén a kalcium-foszfát módszer segítségével. Interferáló kis RNS lentivirális vektor létrehozása: a részletek az eredmények fejezetben találhatóak.

A célsejtek vírusvektorral való megfertőzése: A célsejtek megfertőzése céljából a lenti-, illetve a retrovirális vektort a vírust tartalmazó felülúszót a sejtenyésző tápfolyadékkal 1:2-1:10 arányban hígítva alkalmaztuk a sejteken (polibrénnel kiegészítve). Az inkubáció után a sejteket megmostuk, és normál médiumukban további 2 napig tenyésztettük, majd kísérletre felhasználtuk.

Állatkísérletek: A felhasznált CB-17 SCID egerek egyik része a Charles River Laboratories-tól származott, másik részét a DEOEC Bőrklínika Állatházában tenyésztettük. Szubkután injekció esetében a 6 hetes példányokba egerenként 3×10^6 sejtet fecskendeztünk be az egerek hátbőre alá (n=8). A tumorok méretét hetente mértük, a hetedik héten analízis céljából eltávolítottuk, súlyát megmértük, majd OCT-ben -70°C -on tároltuk. A tüdőkolonizációs kísérlet céljából 2×10^5 sejtet injektáltunk be intravénásan a farokvénán keresztül egerenként (n=12). A hetedik hét végén az egereket elaltattuk, a tüdőt eltávolítottuk, a tüdőben létrejött tumor kolóniákat megszámoltuk, a szövetmintákat H&E festésnek vetettük alá. A metasztázis képződés gátlását célzó kísérlet során 4×10^5 sejtet injektáltunk a SCID

egerekbe a farokvénán keresztül. Az egerek tüdejét a 12-ik hét eltelte után kinyertük, majd hasonlóképpen, a fenti módszer szerint megvizsgáltuk.

Luciferáz vizsgálat: A sejteket 24-lyukú lemezben TOPflash vagy TOPflash-Reporter plazmiddal Lipofectamin 2000 módszerrel tranziensen megfertőztük, majd azokat szérum mentes tápfolyadékban inkubáltuk 37°C-on. Ezt követően a sejteket lizáltuk, és luminométerrel megmértük a luciferáz aktivitást a gyártó előírása szerint.

4. Eredmények

4.1 Notch-1 receptorok expressziójának összehasonlítása naevus pigmentosus és melanoma malignumból nyert betegmintákon

Első lépésként összehasonlítottuk a Notch-1 fehérje jelenlétét 15 naevus pigmentosus-os és 15 melanoma malignummal diagnosztizált beteg szövettani mintájában. A naevus pigmentosusos betegek átlagéletkora 28.26 év (n=15), SD=17.33; a melanoma malignumos betegek átlagéletkora 55.53 év (n=15), SD=15.12 volt. A nemek egyenlő eloszlására ügyeltünk. A szövettani festés során azt találtuk, hogy a Notch-1 receptor a 15 melanomás mintából 10 esetben, míg a naevus pigmentosus estében 15 mintából 1-ben volt detektálható. A Notch-1 receptor a sejtplazmában és a sejtmagban is megfigyelhető. Ez utóbbi arra utalt, hogy a receptor érése során keletkező aktív receptor (N^{IC}) transzlokálódott a nukleuszba, azaz a Notch-1 receptor minden valószínűség szerint funkcionálisan aktív.

4.2 Notch-1 receptor és a targetgének expressziója különböző növekedési fázisból származó humán melanoma sejtvonalakon és melanocitákon

Hat, különböző növekedési fázisból származó melanoma sejtvonalból és három primer melanocita sejtvonalból származó mintán immunoblott analízist végeztünk egy kizárólag az aktív receptort felismerő immunsavót alkalmazva. Eredményül azt kaptuk, hogy a receptor aktív alakja mind a hat melanoma sejtvonalban nagy mértékben expresszálódott, míg a melanociták

közül csak 1-ben. Pozitív (Notch-1-t kifejező) kontrollként SUP-T1 sejteket – humán T-sejtes leukémia sejtvonalat, illetve a N^{lC}/lenti-vel megfertőzött mel888 (mel-N^{lC}) sejteket használtuk. A Jagged-1 (Notch ligand) gén minden sejtvonalban expresszáldott, e tekintetben nem találtunk különbséget a melanociták és a melanoma sejtek között.

A Notch receptorok által leggyakrabban szabályozott targetgének, a HEY1, HEY2, HES1, HES2 mRNS expressziójának mértékét is megvizsgáltuk kvantitatív real-time PCR-ral. Azt találtuk, hogy melanoma sejtekben a feltételezett targetgének közül legalább egy (legerősebben a HES-1) gén aktiválódva volt, viszont a 3 melanocita sejtvonal esetében egyetlen egy sem.

4.3 A Notch útvonal működésének gátlása humán melanoma (RGP, VGP, Met) és melanocita sejtvonalakon

A Notch-receptor működésének (érésének) gátlására egy γ -szekretáz inhibitor, a N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl-l-alanil)]-S-phenylglycine t-butyl ester-t (DAPT) alkalmaztuk alacsony (0.2 μ M) és nagy (1 μ M) dózisban. Minden melanoma sejtvonal a proliferáció csökkenésével reagált a nagyobb dózisa. A kis dózis viszont csak a korai stádiumú sejtekre volt hatással, a metasztatikus sejtvonalak növekedésére nem. Hasonló eredményt kaptunk a kolónianövekedési kísérlet (soft agar assay) alkalmával: a DAPT a kisebb dózisban csak a korai stádiumú sejtekre (WM3248) volt gátló hatással, a metasztatikus melanoma sejtekre (1205Lu) nem. Ezen eredmények alapján egyértelműnek tűnik, hogy a különböző stádiumú sejtvonalak eltérő érzékenységgel rendelkeznek a DAPT-vel szemben.

4.4 A receptor indukálta transzkripció gátlása MAML-1 transzkripciós regulátor blokkolásán keresztül

A Notch receptor specifikusabb és szelektívebb blokkolása céljából egy másik módszert is alkalmaztunk. A MAML1 (ismerten a Notch receptoroknak alárendelt) transzkripciós regulátor funkcionálisan inaktív, trunkált, domináns negatív (DN) formáját overexpresszáltuk WM35, WM3248, WM239a és 1205Lu melanoma sejtekben retrovirális vektor (pBabe) segítségével. A DN-MAML1 fehérje gátolta a sejtnövekedést és a

kolónianövekedést a korai stádiumú melanoma sejtekben, a metasztatikus melanoma sejtekben nem. A sejtprolifерációt MTT módszerrel mértük. A SCID egerekbe oltott DN-MAML1-transzfektált melanoma sejtek lassabban képeztek daganatot. Ezen eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Notch receptorok működése fontos a melanoma sejtek számára, valamint, hogy a Notch által közvetített jel hatása a melanoma növekedési fázisától (RGP, VGP, metasztatikus) is függhet.

4.5 Notch receptor konstitutív aktivációjának előidézése humán melanoma sejtekben

Hogy a Notch jelátviteli rendszer sejtnövekedésre kifejtett, patológiás működését vizsgálni tudjuk, nagy mennyiségű aktív Notch-1 receptort juttattunk be különböző melanoma sejtvonalakba. Notch-1 receptor génszintű vizsgálatára módosított lentivirális vektort alkalmaztunk, azok univerzális fertőzőképessége, alacsony toxicitása és nagyfokú rugalmassága miatt. Munkánk során sikeresen létrehoztunk egy, a Notch intracelluláris (aktív) egységét kódoló lentivirális vektort, és annak, GFP-t kódoló kontroll párját. A virális vírusokkal összesen hat: kettő RGP, kettő VGP és kettő metasztatikus humán melanoma sejtvonalat fertőztünk meg, és azokat in vitro és in vivo vizsgálatnak vetettük alá. A transzgenek sikeres beviteléről fluoreszcens mikroszkop alatt a zöld fluoreszcenciát alapul véve meggyőződünk (a N^{IC} expressziót immunoblottal is ellenőriztük). A további kísérleteink során ezeket a permanensen módosított melanoma sejtvonalakat használtuk, kontrollként a csak gfp-vel módosított verziójukat alkalmaztuk.

4.6 Az állandó génaktiváció hatása a sejtnövekedésre és a kolónianövekedésre agarban

A ³[H]timidin inkorporációs vizsgálat során azt találtuk, hogy a N^{IC}-GFP-vel megfertőzött, korai stádiumú melanoma sejtek nagyobb mértékben osztódtak mint a kontroll sejtek, a metasztatikus sejtvonalakban nem volt eltérés. Az aktív Notch-1 a kolónianövekedésre is hasonló hatással volt: fokozta a korai típusú sejtek (WM35 és SbCl2) kolóniáinak számát agarban, de az agarban egyébként is jól növekvő, metasztatikus sejtekre (WM239A és

1205Lu) nem volt hatással. Mindez azt mutatja, hogy a Notch-1 receptor aktivációja elősegíti a primer melanomák proliferációját, valamint a primer melanomák kihorgonyzás nélküli (anchorage independent) sejtnövekedését. Ez utóbbi ismert a malignus sejtek egyik jellemzője.

4.7. Az állandó génaktiváció hatása az apoptózisra háromdimenziós sejt kultúra modellben

Ezen kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a N^{IC} milyen hatással van a WM278 melanoma sejtek életképességére és növekedésére, ha azokat háromdimenziós szferoid modellben vizsgáljuk. A WM278-NIC-GFP és a WM278-GFP sejtekből készített szferoidokat I-típusú kollagénba implantáltuk, 96 órán keresztül szérumtól és növekedési faktoroktól mentes tápfolyadékban inkubáltuk, majd a szferoidokon a DEAD/LIVE fluoreszcens festést végeztünk. A WM278-GFP sejtvonal szferoidjaiban számtalan élettelen sejtet találtunk, míg a WM278-N^{IC}-GFP sejtekből álló szferoidokban kevés apoptotikus sejtet láttunk. Az utóbbi esetben a sejtek fokozott életképessége a szferoidok nagyobb méretében és a kollagénbe való fokozott invázióban is megnyilvánult. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a Notch-1 receptor aktivációja fokozza a melanoma sejtek életképességét, a sejtek proliferációját, valamint a kollagéninvázió mértékét háromdimenziós sejt kultúra modellben.

4.8. A sejtadhézióra és a sejtadhéziós molekulák expressziójára kifejtett hatás vizsgálata

Egyenlő számú WM278-N^{IC}-GFP és WM278-GFP melanoma sejtet inkubáltunk 24 lukú lemezben 30 percig, majd a *műanyag felszínhez* kitapadt sejteket megszámoztuk. Azt találtuk, hogy a N^{IC}-GFP sejtek jobban kitapadtak mint a kontroll sejtek, azaz a Notch-1 receptor hatására nőtt az adhéziós képességük. Megvizsgáltuk a *homotípusos (sejt-sejt) adhézió* mértékét is a melanoma sejtekben. A műanyaghoz való kitapadás meggátlása céljából a 96-lukú lemezeket agarral fedtük be. 48 órás inkubáció után azt tapasztaltuk, hogy a WM278-N^{IC}-A NIC-GFP sejtek a WM278-GFP-sejtekhez képest nagyobb, és szerkezetükben szervezettebbnek tűnő szferoidokat hoztak létre.

Ez egyértelműen a sejt-sejt adhézió mértékének növekedését jelentette. A sejtadhéziós kapacitás növekedésével konzisztens módon a fokális adhéziós kinázok fokozott aktivációját is detektáltuk a WM-278-N^{IC}-GFP sejtekben. Immunoblottal megvizsgáltuk az E-kadherin, az N-kadherin és a Mel-CAM (a melanoma tumorigenitásával ismert kapcsolatban lévő) sejt felszíni molekulák fehérjeexpressziójának mértékét. Az N-kadherin és Mel-CAM fehérje szintje megemelkedett a N^{IC}-GFP-vel fertőzött sejtekben a GFP-kontrollhoz képest. Adataink azt támasztják alá, hogy a Notch-1 receptor aktivációja fokozza a melanoma sejtek adhézióját, mégpedig a FAK, az N-kadherin és a Mel-CAM működésének manipulálásán keresztül.

4.9. A konstitutív Notch aktiváció hatásának vizsgálata *in vivo*, a SCID egér modell

A SCID CB-17, egy spontán scid mutáció révén létrejött egértörzs. Sajátosságuk, hogy bennük, egy VDJ recombinációt érintő rendellenesség következtében könnyen megfogannak idegen eredetű szövet transzplantátumok, mint pl. humán tumorok. Állatkísérleteinkben 8 hetes, immunglobulint ellenőrzöttek nem termelő hím és női egyedeket használtunk.

Két N^{IC}-GFP-t stabilan expresszáló korai stádiumú melanoma sejt vonalat, a WM 35 és a WM3248 SCID egérbe való szubkután beültetését végeztük el. 7 hetes obszervációs periódus után az állatkísérletet termináltuk, majd a tumorokat megmértük. Eredményként azt kaptuk, hogy a N^{IC}GFP tumorok a kontroll csoport (GFP tumorok) méretét hétszeres mértékben meghaladták. Elmondhatjuk, hogy a Notch-1 receptor onkogénként működik a melanoma esetében.

Egy másik állatkísérletben azt vizsgáltuk, hogy a Notch-1 receptorok milyen hatással vannak a korai stádiumú melanomák progressziójára, a metasztázisképző képességükre. WM3248N^{IC}-GFP és WM3248-GFP sejteket injektáltunk intravénásan, a fark vénán keresztül SCID egerekbe. A WM3248-GFP egerek esetében a tüdőben csak néhány metasztatikus csomót

találtunk, míg a WM3248-N^{1C} sejtekkel kezelt egereknél a tüdőt teljes egészében ellepő, számtalan metasztázis volt látható. A Notch-1 receptor konstitutív aktivációja a korai stádiumú melanoma sejteket egy malignusabb, metasztázis létrehozására fokozottabban képes fenotípus irányába tolta el. Ezt magyarázhatja, az extravazációban, a homing-ban, a melanoma sejtek kitapadásában, illetve teljes adhéziójában szerepet játszó adhéziós molekulák, mint pl. N-cadherin, Mel-CAM fokozott termelődése.

Ezen eredményeket összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a Notch-1 jelátvivő útvonal onkogén szerepet játszik a melanoma kialakulásában, valamint a primer melanomák progressziójában.

4.10. Notch receptor aktiválódásának hatása a β -katenin molekula stabilizációjára

A következő lépésként a Notch-1 receptor működésének részletesebb mechanizmusát vizsgáltuk. Amikor a β -katenin fehérje expresszióját teszteltük immunoblottal, észrevettük, hogy a N^{1C}-GFP-lenti-vel transzfektált korai stádiumú melanoma sejtekben (Sbcl2, WM35, WM115, WM3248 és WM278) a Notch overexpresszió a β -katenin fehérje mennyiségét fokozta a GFP-(kontroll) sejtekhez képest. A metasztatikus melanoma sejtekben nem észleltük ezt a változást, ami ismét a Notch tumorstádiumtól függő működésére utalt. Eredményünket alátámasztja, hogy a Notch-1 éréseinek blokkolása (DAPT kezelés) csökkenti a β -katenin fehérje termelődését.

Megbizonyosodtunk arról is, hogy a Notch receptor által indukált β -katenin fehérje aktívan működik-e, a human T-sejt faktor-1 (TCF) gén (egy, a β -katenin által szabályozott génszakasz) transzkripciójának mérésén keresztül. A TCF-luciferáz teszt azt mutatta, hogy a WM3248-N^{1C}-GFP és WM115-N^{1C}-GFP sejtekben az aktívan működő TCF mennyisége jelentősen nagyobb mint a kontroll sejtekben, azaz a Notch hatására termelődő β -katenin a melanoma sejtekben működőképes.

A következő lépésként a β -kateninnek a sejtől való stabil „kiütése” (knockout) céljából egy lentivírus szerkezetbe illesztett, kis interferáló RNS-t kódoló vektort hoztunk létre. Egy korábban leközölt, emlős sejtekben tartós génelcsendesítést eredményező siRNS eljárás alapján a gátló szakaszt egy emlős sejtekben használatos expressziós vektorba, az H1UG-be illesztettük be. Három különböző interferáló RNS vektort szerkesztettünk meg. A létrehozott siRNS-t kódoló lentivirussal a melanoma sejteket megfertőztük, és a leghatásosabbat kiválasztottuk. Ezután a WM35-N^{IC}-GFP és WM3248-N^{IC}-GFP sejt vonalakat megfertőztük a kis interferáló RNS-t tartalmazó, permanens változást létrehozó lentivirussal. Ezáltal két újabb stabil sejt vonalat hoztunk létre, amelyeket β -kat-siRNA/WM35-N^{IC}-nek és β -kat-siRNA/WM3248-N^{IC}-nek neveztünk el. A β -katenin csökkent szintjét az új sejt vonalakban immunoblottal ellenőriztük le, ahol a kontrollhoz képest 78%-os (WM35), illetve 90%-os (WM3248) csökkenést tapasztaltunk. Az in vitro kísérletekben a β -katenin szupressziója szignifikánsan csökkentette a Notch-1 által indukált sejtprolifерáció mértékét a melanoma sejtekben. Ezt magyarázhatja az, hogy a β -katenin gátlása a programozott sejthalál, az apoptózis indukcióját idézi elő. Amikor az apoptózis mértékét megvizsgáltuk (egyszálú, ssDNS teszt), azt találtuk, hogy a csökkent β -katenin-szinttel egyidőben növekedett az életképtelen sejtek száma.

A következő lépésként a β -kat-siRNS/WM3248-N^{IC} sejteket SCID egérbe intravénásan injektáltuk, és úgy találtuk, hogy a β -katenin gátlása a melanoma sejtekben kevesebb tüdőmetasztázist eredményezett a kontroll egerekhez képest. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a Notch-1 receptor onkogén hatása melanoma sejtekben minden bizonnyal /minimum részlegesen/ a β -katenin molekula aktivációján keresztül valósul meg, illetve, hogy a β -katenin molekula a jelátviteli kaszkádban a Notch-1 receptor szintje alatt működő (downstream) elem.

5. Megbeszélés

A most bemutatásra kerülő munkában a Notch receptorok szerepét és jelentőségét vizsgáltuk a melanoma progresszió mechanizmusában különböző kísérleti rendszerekben. Célunk az volt, hogy felderítsük a Notch-1 receptor aktiváció okozta biológiai elváltozásokat melanoma sejtvonalakban, illetve *in vivo* SCID-egér tumormodellen. Reményeink szerint ezúton sikerült rámutatnunk egy új molekulára, amely ellen kifejlesztett terápiás szer akár a melanoma kezelésében is szerepet nyerhet.

Munkánk során kimutattuk, hogy a Notch-1 receptor jelátvivő rendszere humán melanoma malignumban aktívan funkcionál. A Notch-1 fehérjét kimutattuk a melanoma sejtvonalakon, illetve klinikai betegmintákon, viszont benignus naevusban, illetve melanocita sejtvonalakon nem volt kimutatható. A melanoma érintettségét vizsgálatunk kezdetekor mindössze néhány publikáció vetette fel, és egy sem tanulmányozta részleteiben. Kimutattuk, hogy a Notch-1 útvonal komponensei, pl. a Jagged-1 ligand, a Notch-nak alárendelten működő molekulák (HEY1, HEY2, HES1, HES2) is expresszálódnak mindhárom növekedési fázisból származó melanoma sejtvonalakon. Hasonló eredményt kaptak Hoek és tsai cDNS alapú microarray segítségével.

A tumorok progressziója egy komplex folyamat, aminek lezajlásához számos különböző, celluláris szinten zajló változásra mint pl. megnövekedett sejtproliferáció, a túlélőképesség, migráció, invázió, stb van szükség. Mi a sejtproliferációt és a sejtek kihorganyzódás független növekedését vizsgáltuk agarban. A Notch-1 receptorok működését sejtvonalakban blokkolva (mindkét módszerrel) azt találtuk, hogy a melanoma sejtek proliferációja és a kihorganyzódás független növekedése agarban gátolható. Suwanjonee és mtsai szintén beszámoltak arról, hogy ha a Notch rendszert γ -szekretáz inhibitorral gátolják, a sejtproliferáció gátolható lymphoma és hepatoma sejtvonalakban.

A legtöbb emberi és állati eredetű sejt növekedéséhez szükséges annak valamilyen felszínhez történő kitapadása. A sejtek a kihorgonyzástól való függőség révén szabályozni képesek a sejtosztódás mértékét. Ez a kontroll mechanizmus a transzformálódott sejtekben elvész. Számos sejtípusban a kihorgonyzódásfüggetlen növekedés egyet jelent a tumorigenitással és invazivitással. A kolónianövekedés agarban (angolul „soft agar assay”) egy rutin kísérleti eljárás, amellyel a sejtek kihorgonyzástól független növekedése vizsgálható. Eredményeink szerint a Notch-1 receptor gátlása DAPT-vel vagy transzkripció gátlással csökkenti a VGP és RGP fázisú melanoma sejtek növekedését agarban, metasztatikus sejtekre azonban nincs hatással. Úgy tűnik, hogy azok a lehetséges egyéb szignál útvonalak, amelyek a Notch útvonallal kollaborálhatnak, valószínűleg különbözőek a primer és a metasztatikus melanoma sejtek esetében.

A Notch receptorcsalád az egyes ráktípusok patomechanizmusában többféle szerepet is játszhat. Ez a fajta diverzitás a szöveti homeosztázis és a fejlődés szabályozásában betöltött szerepe során is jellemző a Notch receptorokra. Az általunk talált onkogén funkcióval ellentétben a bazális- és laphámsejtes karcinómában (egérmodellben) a Notch 1 receptor tumorellenes hatású. Kimutatták, hogy a Notch szignálrendszer többféle - pozitív és negatív - szerepet is játszhat a sejt differenciálódás, a sejtproliferáció, a sejtek életképességének szabályozásában, valamint a tumorgenezis során. Ezért nem meglepő az, hogy ugyanazon szervből kiinduló, de különböző típusú malignómáknál mint a pl. a bazálsejtes karcinóma és a melanoma malignum, a Notch-receptor ellenkező hatást vált ki. A B-sejtek fejlődése során a Notch-1 növekedésleállást és apoptózist okoz, míg T-sejtekben sejtproliferációt indukál. A Notch szignálrendszer egyrészt onkogénként viselkedik, és a sejteket proliferációra serkenti (akut lymphoblastos T-sejtes leukémia, egér emlőtumor, transzformálódott veseepithelsejtek), másrészt pedig tumorszuppressorként a sejt növekedés ellen hat (egér bazálsejtes karcinoma, emberi kissejtes tüdőrák, hepatocelluláris karcinóma, prosztatatarák).

Munkánkban először számolunk be egy olyan laboratóriumi kísérletsorozatról, amely a Notch-1 konstitutív aktivációjának hatását vizsgálja humán melanoma sejtvonalakon. A Notch-út vonal aktivációja melanoma sejtekben a sejtproliferációt és a kihorganyzásfüggetlen növekedést fokozta *in vitro* és *in vivo* (SCID egér modellben). Ez a hatás kísérleteinkben stádiumfüggő karakterisztikát mutatott. A Notch-1 receptor elősegítette a primer melanomák progresszióját, azonban nem volt, vagy nagyon kis hatással volt a metasztatikus melanomákra. Cervix carcinómában is kimutatták a Notch receptorok stádiumtól függő működését. A Notch-1 receptor a cervix rák korai stádiumában onkogénként, a késői stádiumában pedig tumorszuppresszorként viselkedik. A proliferáció növelésének hátterében természetesen több dolog állhat, a legvalószínűbb, hogy a Notch-1 receptor aktivációja a sejtciklusban részt vevő proteinek (pl. ciklin D1) expresszióját szabályozza. A Notch általi tumoros transzformációhoz valószínűleg több genetikai változás egyidejű megléte szükséges. Az, hogy a Notch aktivációjának a hatása a tumor stádiumától függ, tulajdonképpen megegyezik az embrionális fejlődés során tapasztalt –és jól ismert– Notch működés jellegével, amely a „helytől és időtől”, a pillanatnyi kontextustól függő szabályozást jelenti. Ennek a pontos mechanizmusa azonban egyelőre ismeretlen.

Munkánk során kimutattuk, hogy Notch-1 aktivációt követően megnő a melanoma sejtek adhézions kapacitása, ezzel párhuzamosan megemelkedik az N-kadherin és a Mel-CAM expressziója. Azt is kimutattuk, hogy Notch-1 fokozza a sejtek invázióját, és életképességét háromdimenziós szferoid modellben, illetve bebizonyítottuk, hogy Notch-1 a fokális adhézions kináz (FAK) aktiválódását idézi elő. Eredményeink szerint a Notch-1 konstitutív aktiválódása fokozza a tüdőmetasztázisok kialakulását SCID egér modellen. Az N-kadherin, és Mel-CAM adhézions molekulák szintjének változása egy a lehetséges mechanizmusok közül, amelyek Notch-1 aktiváció esetén a sejtnövekedés, migráció, adhézión és metasztázisképződés fokozódásához vezetnek. Az is elképzelhető, hogy a Notch-1 receptorok a FAK kinázok működését a kadherineken keresztül szabályozzák. A Notch-1 expresszió FAK kinázra kifejtett közvetlen hatását is megvizsgáltuk, és azt találtuk, hogy

a Notch-1 aktiváció fokozta az aktív, foszforilált állapotú FAK kinázok mennyiségét.

Egy korábbi közlemény már felvetette annak lehetőségét, hogy a β -katenin molekula lehet közvetlenül a felelős a Notch-1 receptor által kiváltott hatásért, és hogy ez a molekula közvetíti a Notch-1 anti-tumor hatását egér bazálsejtes karcinómában (Nicolas és mtsai, Nature Genetics). Mi azt találtuk, hogy a β -katenin fokozott működése melanoma malignumban a Notch-1 receptor onkogén hatásának a közvetítője. Az, hogy a β -katenin által közvetített hatás onkogén vagy tumor-szupresszor jellegű lesz-e, az valószínűleg a Notch-1 aktiváció mértékétől és módjától (ligand típusa) függ, illetve azt a Notch-1-nek az illető szövetben betöltött szerepe határozhatja meg. A β -katenin molekula mutáció okozta aberráns aktiválódását, a vad típusú β -katenin fehérje nagy mértékű felhalmozódását a sejtmagban, vagy az IGF-szignaling okozta stabilizációját már korábban is összefüggésbe hozták a melanoma progresszió folyamatával. A β -katenin molekula fontos szerepet játszik az E- és N-kadherin $-Ca^{++}$ -függő sejt felszíni molekulák-mediálta sejtadhézió szabályozásában. A β -katenin fontos része a Wnt jelátvivő útvonalnak is, ahol a TCF gén transzkripcióját indukálja.

Eredményeink azt mutatják, hogy a Notch-1 receptor általi β -katenin termelődés (vagy stabilizálódás) csak a korai fázisú RGP vagy VGP sejtvonalak sajátossága, a metasztatikus eredetű sejtvonalakban mint pl. a 1205Lu, nem következik be. Ennek magyarázata az lehet, hogy a Notch-1 receptor, és annak target génjei a NIC overexpressziója nélkül is expresszálva vannak a metasztatikus melanoma sejtvonalakban. A külsőleg előidézett, tartós Notch1 aktiváció már nem képes a β -katenin fehérje szintjét tovább növelni, és képtelen a sejtprolifерáció további fokozására. Valószínű, hogy a metasztatikus sejtekben már minden onkogén hatású útvonal aktív, és az alsóbb rendű elemek (β -katenin vagy a sejt-ciklus gépezete) maximális kihasználtságon működnek, és teljesítményük tovább nem fokozható. Az is elképzelhető, hogy valamilyen, eddig nem ismert visszacsatolós szabályozó mechanizmusok működnek a metasztatikus sejtekben, amelyek

antagonizálják a Notch receptorok hatását. A β -kateninnek a Notch rendszerrel való összefüggésbe hozásnak a jelentőségét az adja, hogy ezen a molekulán keresztül két igen fontos sejten belüli szabályozórendszer: a Notch és a WNT útvonal kapcsolható össze. A Notch és Wnt útvonal kapcsolatát vetették fel Alves-Guerra és mtsai is, akik kimutatták hogy a MAML-1 nem csak a Notch-1 receptor, hanem a β -katenin útvonal koaktivátora is.

Az RNS-interferencia (RNAi) egy pár éve felfedezett jelenség, egy univerzális szabályozó mechanizmus, amely azon alapul, hogy kis kétszálú RNS darabok (siRNA) egy másik fehérjéhez (Slicer) kapcsolódva egyszálúvá alakulnak, egy RNAi silencing complex-t (RISC) hoznak létre, amely képes felismerni a kis RNS darabbal komplementer mRNS molekulákat és azokhoz kötődve katalizálni lebontásukat. Munkánk során létrehoztunk egy kis interferáló RNS szakaszt kódoló retrovirális vektort a β -katenin szintjének gátlására. Kimutattuk, hogy a β -katenin molekula expressziójának kis interferáló RNS-sel való gátlása a melanoma sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésének csökkenéséhez vezet, valamint apoptózist indukál. Következtetésként elmondhatjuk, hogy a β -katenin egy lényeges elem a melanoma sejtek növekedésének szabályozásában. Állításunk helyességét, és a β -katenin szerepének fontosságát igazolta Delmas és csoportja, akik kimutatták, hogy a β -katenin a melanocitákban immortalizációt okoz a p16/Ink4a szupresszállásán, és a Ras-sal való ko-operáláson keresztül.

A humán malignomák kezelésének frusztráló velejárója, hogy a daganatsejtekből a gyógyszeres kezelés alatt vagy azt követően rezisztens klónok alakulnak ki. Ez a lépés a tumor kezelésre refrakter kiújulásához, és kezelhetetlen metasztázisokhoz vezethet. A daganatokra individuálisan jellemző genetikai eltérések célzott kezelése is felvetődik, mint új terápiás lehetőség. Az eukarióta sejtek nagyon komplexen működő, a differenciálódást, sejt proliferációt és a sejthalált szabályozó rendszerei: a WNT, Sonic-Hedgehog, és Notch útvonal lehetnek ennek hasznos célpontjai. Felmerült, hogy a Notch-útvonal elleni gyógyszerek kifejlesztése révén akár a

korlátlan osztódási kapacitással rendelkező, terápia rezisztens daganat-
őssejtek eliminálhatóak. Reméljük, hogy munkánkkal hozzájárultunk ahhoz,
hogy ennek a kipróbálása melanoma malignum esetében is megfontolásra
kerüljön.

6. Új megállapítások:

1. A Notch-1 receptor és a Notch útvonal elemei expresszálódnak humán melanomában.

2. A Notch-1 receptor blokkolása gátolja az RGP és VGP melanoma sejtek szaporodását és kihorgonyzásfüggetlen növekedését agarban.

3. A Notch-1 receptor aktív alakjának expressziója a melanoma sejtekben lentivirális vektorral sikerrel fokozható.

4. A Notch-1 receptor konstitutív aktiválása fokozza az RGP és VGP melanoma sejtek proliferációját, kihorgonyzásfüggetlen növekedését *in vitro*, fokozza a szubkután tumor növekedését illetve a tüdőkolonizáció mértékét *in vivo* SCID egér modellen.

5. A Notch-1 receptor konstitutív expressziója fokozza a melanoma sejtek adhézióját, gátolja a melanoma sejtek apoptózist 3D szferoid modellben, fokozza az N-kadherin, Mel-CAM adhéziós molekulák expresszióját, valamint a fokális adhéziós kináz foszforilációját.

6. A Notch-1 receptor aktivációja fokozza a melanoma sejtekben található szabad β -katenin mennyiségét az RGP és VGP sejtekben, míg a metasztatikus fázisú sejteken nem.

7. A β -katenin gátlása a permanensen aktív Notch-1 receptorral rendelkező melanoma sejtek proliferációját csökkenti, apoptózist indukál *in vitro*, valamint csökkenteni képes a WM3248NIC általi tüdőkolonizáció mértékét SCID egér modellen.

7. Összefoglalás

A Notch-1 receptor transzmembrán fehérje, melynek feladata a sejt differenciálódás, sejtprolifерáció és a sejthalál szabályozása az embrionális fejlődés során. A Notch-1 receptort a ligand kötődését követően metalloproteázok hasítják, majd intracelluláris doménja a nukleuszba transzlokálódik, és transzkripciót indukál. A Notch receptorok szerepét számos szolid tumorban karakterizálták, azonban szerepe melanoma malignumban nem ismert.

Munkánkban a Notch-1 receptor és az azon keresztül történő jelátvitel szerepét vizsgáltuk a melanoma progressziójában. Kimutattuk, hogy a Notch-rendszer funkcionálisan aktív melanoma malignumban, a Notch-1 receptor expresszálódik melanoma malignum szövetmintákon. Kimutattuk, hogy a Notch-1 út gátlásával a korai stádiumú melanoma sejtvonalak növekedése csökkenthető. Kísérleteinkben a Notch-1 intracelluláris doménjének konstitutív expressziója fokozta a melanoma sejtek *in vitro* és *in vivo* proliferációját, valamint kihorgonyzásfüggetlen növekedését a korai stádiumú sejtekben, azonban a metasztatikusokban nem. Megállapítottuk, hogy a Notch-1 receptor overexpressziója a melanoma sejtek metasztatizáló képességét fokozta. A Notch-1 receptor aktiváció ezen túlmenően a melanoma sejtek erőteljes adhézióját, az N-kadherin és Mel-CAM expresszióját, valamint a FAK kináz foszforilálódását idézte elő. A Notch-1 aktiváció fokozza a tumorsejtek túlélését háromdimenziós szferoid modellben. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a Notch-1 receptor működésének onkogén hatása a β -katenin molekulán keresztül valósul meg. A β -katenin fehérje szintje eleválódik Notch-1 aktivációt követően, és ennek inhibíciójával a Notch-1 indukálta tumornövekedés és metasztázisképzés megfordítható.

Következtetésként levonhatjuk, hogy a Notch-1 receptor egy aktív mechanizmus a melanoma pathogenezisében. Eredményeink szerint a Notch-1 receptor egy β -katenin függő, stádium-specifikus módon segíti elő a melanoma sejtek progresszióját. Először mutattuk ki a Notch-1 receptor onkogén szerepét melanoma malignumban.

8. Tárgyszavak:

Melanoma malignum, Notch-1 receptor, tumor progresszió, beta-katenin, SCID-egér modell, γ -szekretáz, lentivirális vektor

9. Közlemények:

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

Balint K, Xiao M, Pinnix C.C, Soma A, Veres I, Juhász I, Brown E.J, Capobianco A.J, Herlyn M, Liu Z-J: Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin mediated human primary melanoma progression. *Journal of Clinical Investigation*, 2005 November 1; 115(11): 3166-3176, **IF: 15.75**

Liu ZJ, Xiao M, **Balint K**, Smalley K.S, Brafford P, Qiu R, Pinnix C.C, Li X, Herlyn M: Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and upregulating N/cadherin expression, *Cancer Research*, 2006 April.15; 66(8): 4182-4190, **IF: 7.65**

A kutatási területhez kapcsolódó egyéb közlemények:

Liu ZJ, Xiao M, **Balint K**, Soma A, Pinnix C.C, Capobianco AJ, Velazquez O.C, Herlyn M: Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1, *FASEB Journal*, 2006, May, 20(7): 1009-1011, IF: 6.72

Egyéb közlemények:

Gáspár K, **Bálint K**, Veres I, Hunyadi J, Juhász I.: *In vivo* cc. Basocellulare modellel szerzett tapasztalatok, *Bőrgyógyászati és Venereológiai Szemle*, 2004, 80. Évf. p.129-132

Fukunaga-Kalabis M, Martinez G, Telson S.M, Liu ZJ, **Bálint K**, Juhász I, Elder DE, Perbal B, Herlyn M.: Downregulation of CCN3 expression as a potential mechanism for melanoma progression, *Oncogene*, 2007, Oct 29, IF: 6.58

Buckanovich RJ, Facciabene A, Benencia F, Sasaroli D, **Bálint K**, Katsaros D, O'Brien-Jenkins A, Gimotty PA, Coukos G.: Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy, *Nature Medicine*, 2008 Jan;14(1):28-36, IF: 28.588

Bálint K, Conejo-Garcia JR, Buckanovich R, Coukos G. Role of vascular leukocytes in ovarian cancer neovascularization. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 622:273-80, IF: 0.663

A kutatási területhez kapcsolódó előadások és poszterek:

K.Bálint, Z-J.Liu, M.Herlyn Novel Role for Notch signaling in melanoma progression, 43rd, Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, San Francisco, CA, 2003

K.Balint, Z-J.Liu, M. Xiao, C.C. Pinnix, M.Herlyn: Notch-1 regulates melanoma growth *in vivo*, 95th Congress of the American Association for Cancer Research, Orlando, FL, 2004

Z-J Liu, **K.Bálint**, A. Soma, H. Chen, M. Xiao, M.Herlyn: Notch1 signaling differentially regulates proliferation of melanoma and endothelial cells, 97th Congress of the American Association for Cancer Research, Orlando, FL, 2004

K.Bálint, Z-J Liu, M. Xiao, C. Pinnix, A. Soma, M. Herlyn: Novel Role for Notch Signaling in Melanoma, 2nd International Melanoma Research Congress, Phoenix, AZ, 2004

K. Balint, Z-J Liu, M Xiao, C. Pinnix, A. Soma, I. Veres, I. Juhasz, M. Herlyn: Activation of Notch-1 Signaling Promotes Melanoma Progression, 10th World Congress of Skin Cancer, Vienna, Austria, 2005

Z-J Liu, M. Xiao, R-H Qiu, **K.Bálint**, M. Herlyn: Activated Notch-1 induces mitogen-independent melanoma cell proliferation, 98th Congress of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, 2005

M Herlyn, Z-J Liu, C Pinnix, **K Bálint**: Notch signaling in angiogenesis and melanoma progression, AACR-NCI-EORTC international conference: Molecular targets and cancer therapeutics, Philadelphia, PA, 2005 Nov

Lee, J. T.; Pinnix, C. C.; McDaid, R.; Liu, Z. J.; **Bálint, K.**; Beverly, L. J.; Brafford, P. A.; Xiao, M.; Nathanson, K. L.; Bengston, A.; Pollock, P. M.; Weeraratna, A. T.; Nickoloff, B. J.; Capobianco, A. J.; Herlyn, M: Activated Notch1 Transforms Primary Human Melanocytes, 4th International Melanoma Congress, New York, NY, USA, 2007

A közlemények összegzett impakt faktora: 65.951

Független citációk száma: 103