

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**INVAZÍV FENOTÍPUSSAL ÖSSZEFÜGGŐ GENOMIKAI
VÁLTOZÁSOK MALIGNUS MELANOMÁBAN**

Koroknai Viktória

Témavezető: Dr. Balázs Margit



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Invazív fenotípussal összefüggő genomikai változások malignus melanomában

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

Írta: Koroknai Viktória okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
(Megelőző orvostan és népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Tímár József, az MTA doktora
Dr. Balogh István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület
könyvtára I. emelet
2020. augusztus 26. 11.00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bálint Bálint László, PhD
Dr. Tóvári József, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora
tagok: Dr. Bálint Bálint László, PhD
Dr. Tóvári József, PhD
Dr. Balogh István, PhD
Prof. Dr. Tímár József, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb
tanterem
2020. augusztus 26. 13:00 óra

BEVEZETÉS

A malignus melanoma az egyik legagresszívabb humán daganat, mely különböző szerveket érintő fokozott metasztázis képzéséről ismert. Bár előfordulása ritka, mindössze az összes bőrdaganat 3–5%-át teszi ki, ennek ellenére a bőrdaganatok okozta halálozások megközelítőleg 75%-áért felelős. Évente 230.000 új esetet regisztrálnak világszerte, amelyből 55.000 végződik halállal; azonban a kormegoszlásra standardizált előfordulása (esetek száma/100.000 fő) eltérő. Bár a fiatalabb korosztályt érintő melanomás esetek száma az elmúlt években kismértékben csökkent, előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat, beleértve Magyarországot is.

Epidemiológiai vizsgálatok magas kockázati tényezőként azonosították az ultraibolya B (UVB) sugárzás, valamint a gyermekkorban elszenvedett napégés és a melanoma kialakulása közötti összefüggést. A növekvő számú terápiás lehetőségek ellenére napjainkban is a korai diagnózis és a tumor teljes sebészeti eltávolítása a legeredményesebb kezelési lehetőség a melanomás betegek számára.

A melanoma malignum és metasztatikus terjedése

A melanoma a bőr epidermális melanocitáiból kiinduló malignus daganat. A melanocita sejtek neuroektodermális eredetű melanoblasztokból differenciálódnak, melyeket nagymértékű migráció jellemez az egyedfejlődés során. A melanocita sejtek differenciálódása különböző transzkripciós faktorok irányítása alatt áll, mint pl. a microphthalmia-asszociált transzkripciós faktor (MITF), mely a SOX10 és PAX3 transzkripciós faktorokkal együttműködve befolyásolja melanomagenezisben szerepet játszó gének expresszióját.

Az áttétképzés egy többlépcsős folyamat, mely a következő lépésekből áll: (1) tumor sejtek inváziója a környező szövetekbe (2) a transzendotheliális migráció (intravazáció), (3) a sejtek túlélése a keringési rendszerben, (4) extravazáció és (5) proliferáció, ami metasztatikus kolonizációhoz vezet. Az eredményes metasztázis képzéshez az invazív melanoma sejtek képesek a citoskeletális rendszerük, valamint az extracelluláris mátrixhoz (ECM) és a környező sztrómához való kötődésük módosítására. A környező

szövetek inváziójának feltétele, hogy a tumor sejtek képesek legyenek áttörni a bazális membránt.

A melanoma sejtek plaszticitása

A melanoma sejtek inváziójának, azaz az extracelluláris mátrix és a környező szövetek infiltrációjának feltétele, hogy a sejtek képesek legyenek megváltoztatni az alapvető, epiteliális fenotípusukat, beleértve az apicalis-basolateralis polarizációt, a bazális membrán integritását és a sejt-sejt adhéziót, aminek következtében létrejön az invazív fenotípusú daganatsejt. A tumor sejtek különböző migrációs stratégiával rendelkeznek. Amellett, hogy a sejtek képesek kollektív invázióra, vagyis többsejtes egységként mozogva bejutni a környező szövetekbe, képesek önállóan is közlekedni a bazális membránon keresztül a különböző szöveti típusok között. Az egysejtes inváziós stratégián belül két típust különböztetünk meg, a mesenchymális és az amoeboid migrációt.

A különböző jelátviteli útvonalak, melyek hozzájárulhatnak az invazív sejtek plasztikus tulajdonságához, számos korábbi kutatás témáját képezik. A Rho GTP-áz jelátviteli útvonal egy specifikusan vizsgált molekuláris útvonal ezen a területen, mivel a Rho molekulacsalád kulcsfontosságú szerepet játszik a citoszkeletális mozgás, az aktomiozin kontrakció, az adhézió, a proliferáció és a sejthalál kontrollálásában. Az amoeboid típusú sejtmozgás a Rho-ROCK és a Cdc42 jelátviteli útvonalak irányítása alatt áll, melyek az aktomiozin kontrakciót befolyásolják, míg a mesenchymális migrációt használó sejtekben a Rac1 útvonal irányítása alatt zajlik az aktin molekulák összeszerelése.

Genetikai eltérések invazív melanomákban

A melanomák kialakulása során gyakran megfigyelhetők a MAPK útvonal aktivitását kísérő szomatikus mutációk, mint a *KIT*^{L5J6P}, *NRAS*^{Q61K} vagy *BRAF*^{V600E} gének mutációja, vagy a *PTEN*, *P14ARF* és *P16INK4a* tumorszupresszor gének deléciója, melyek a sejtciklus szabályozásában játszanak szerepet. Az intenzív kutatások ellenére az invazív képességgel összefüggő mutációkról és kópiaszám eltérésekről ismereteink továbbra is hiányosak.

A *BRAF* gén funkciónyeréses mutációját, mely amellet, hogy fokozza a sejtek túlélését és proliferációját az ERK útvonal folyamatos aktivizálása által, az invázió és metasztázis képzés folyamatával is összefüggésbe hozták.

Egy melanoma progressziót leíró modell szerint a melanomagenézis folyamatában a MAPK útvonalat érintő mutációk (*BRAF* és *NRAS*) már a kaszkád legelején jelen vannak, míg a *PTEN* és *TP53* tumorszupresszor gének mutációi inkább az előrehaladottabb primer tumorokat jellemzik. A modell szintén kiemeli a *CDKN2A* funkcióvesztését az invazív fenotípussal összefüggésben.

Az invazív melanomák génexpressziós mintázata

A génexpressziós mintázatuk alapján a melanomák két nagy csoportba sorolhatóak. Az egyik csoportba a proliferatív fenotípussal jellemezhető daganatok tartoznak, melyeket a *MITF* és más melanociták differenciálódásáért felelős gének (*TYR*, *DCT* és *MLANA*), valamint velőcső eredetű sejtek differenciálódásáért felelős gének (*SOX10*, *TFAP1A* és *EDNRB*) overexpressziója jellemez. A másik csoportba az úgynevezett invazív fenotípusú melanomák tartoznak, melyekre a fent említett gének csökkent kifejeződése jellemző, és olyan géneket expresszálnak, melyek az extracelluláris mátrix bontásáért (TGFB útvonal) és az epiteliális-mesenchymális tranzícióért (EMT) felelősek (*ZEB1*, *COL5A1*, *SERPINE1* és *WNT5*). Ez az invazív génexpressziós mintázat lassúbb proliferációval és fokozottabb motilitással társul. A melanoma sejtek a különböző környezeti hatások eredményeképpen képesek váltani a proliferatív és invazív fenotípus között.

A proliferatív és invazív fenotípus megkülönböztetésére leírt genetikai mintázatot tovább bővítették olyan szabályzó transzkripciós faktorok azonosításával, melyek fő regulátorokként szerepet játszanak az egyes mintázatok kialakításában. Ennek megfelelően proliferatív fenotípus esetén a *SOX10* és *MITF* transzkripciós faktorokat, míg az invazív sejtekben a *TEAD* és *AP1* géneket azonosították, mint központi szabályzó faktorok.

Invazív képességgel összefüggő DNS metilációs mintázat

Különböző daganat típusok, így a melanoma esetében is a daganat genom globális hipometilációs mintázata figyelhető meg. Másrészt azonban a transzkripcionálisan aktív gének promóter hipermetilációja a gének csendesítésével társul, amit több tumorsuppresszor génre vonatkozóan megfigyeltek. A proliferatív és invazív transzkripciós szignál korrelációját írták le permisszív és represszív kromatin állapottal összefüggésben, ami előrevetíti az epigenetikai szabályozó folyamatok fontosságát az invazív képességgel rendelkező sejtek vizsgálatában.

A teljes epigenomot vizsgáló (EWAS) kutatások lehetőséget adnak az olyan potenciális biomarkerek azonosítására, melyek klinikai szempontból is hasznosak lehetnek. Az ilyen kutatásoknak köszönhetően számos, a melanocita differenciálódás folyamatát érintő gén metilációját azonosították, köztük a *KIT*, *PAX3*, *SOX10* géneket, a *HOX* molekula család különböző tagjait és a *MITF* gént. Fontos megjegyezni, hogy ezeket az EWAS vizsgálatokat főként metasztatikus melanoma mintákon végezték, így különösen fontos az olyan korai molekuláris eltérések azonosítása, melyek hozzájárulhatnak az invázió folyamatának megértéséhez

CÉLKITŰZÉSEK

A kutatásunk célja olyan molekuláris eltérések azonosítása volt, melyek összefüggést mutatnak a melanoma sejtek invazív képességével, ami a metasztázis képzés egyik első lépése. Célunk volt továbbá az invázióhoz köthető DNS metilációs eltérések meghatározása és ezek hatásának vizsgálata a gének kifejeződésére, az invazív sejtek szelektált populációjának vizsgálatával.

Vizsgálataink céljai:

1. A kromoszóma kópiaszám eltérések és az invazív képesség közötti kapcsolat meghatározása melanoma sejtvonal modellrendszerekben array komparatív genom hibridizáció (array CGH) technikával azzal a céllal, hogy a sejtek invazív képességével összefüggő eltéréseket ismerjünk meg.

2. A *BRAF* és *NRAS* mutációkkal társuló genetikai eltéréseket azonosítása invazív sejtekben.
3. Melanoma sejtvonalakból szelektált invazív sejtpopuláció izolálását követően az invázióval összefüggő genomikai eltérések azonosítása, az invazív sejtek génexpressziós és metilációs mintázatának meghatározását követően a metilációs eltérések génexpresszióra gyakorolt hatásának elemzése.
4. A nyilvánosan elérhető adatbázisok felhasználásával annak elemzése, hogy a szelektált invazív sejtvonalakban megfigyelt kópiaszám változások és metilációs eltérések közül melyek találhatók meg melanoma szövetekben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Vizsgálatainkat 12 primer tumor (WM35, HT199, WM1789, WM793B, WM3211, WM1361, WM902B, WM39, WM278, WM983A, WM1366, WM3248) és 6 metasztázis eredetű melanoma sejtvonalakon (WM1617, WM983B, A2058, HT168, M24, M24-MET) 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.

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 sejtsuszpenziót tartalmazott szérummentes 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 nagyításon 7 különböző látótérben számoltuk le és átlagoltuk.

Az invazív sejtek szelektálása

A BD Biocoat Matrigel inváziós karma alsó kamrájába átjutó sejteket 0.5% trypsin/0.2% EDTA oldattal (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) kezeltük, hogy a sejteket visszanyerjük a membránról. Az így szelektált sejteket tovább tenyésztettük DNS és RNS izolálás céljából.

Sejtproliferációs assay

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

Array CGH analízis

A DNS minták izolálását G-spin Genomic DNA izoláló kittel (Intron Biotechnology Inc., Seongnam, Korea) végeztük. A DNS mintákat Cytochip ISCA 8×60 array-re (BlueGnome Ltd, Cambridge, UK) hibridizáltattuk, az adatok kiértékeléséhez a BlueFuse Multi v2.2 (BlueGnome Ltd) és a Nexus Copy Number 6.1 (BioDiscovery Inc., Hawthorne, California, USA) szoftvereket használtuk. A kópiaszám csökkenés és növekedés detektálásához $\pm 0,3 \log_2$ értéket használtuk, míg a nagymértékű amplifikáció küszöbértéke 0,6 volt, a homozigóta deléciót pedig -1,0 érték jelentette. Fisher's exact tesztet használtunk az invazív és nem invazív sejtvonalak közötti, valamint a szelektált invazív sejtpopuláció és az eredeti sejtvonalak közötti szignifikáns kópiaszám különbségek meghatározásához.

DNS metilációs elemzés

A metilációs vizsgálatokhoz biszulfít konvertált (EZ DNA Methylation kit; Zymo Research, Irvine, CA, USA) DNS mintákat használtunk. A módosítás minőségét PCR (HotStarTaq Master Mix kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) technikával ellenőriztük módosított és eredeti GAPDH primerek alkalmazásával. A DNS-metilom profil

meghatározását Illumina Infinium II Human Methylation 450K (HM450K) BeadChip assay-vel (Illumina, San Diego, CA, USA) végeztük.

Az adatok feldolgozása különböző Bioconductor alprogramok segítségével és az R v.3.2.2 használatával történt, mely során a metilációs beta értékeket logaritmikusan transzformálva megkaptuk az M értékeket, és ezekkel végeztük a további parametrikus statisztikai elemzéseket. A DNS metilációs változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha az FDR korrigált p értékek 0,05 alatt voltak.

Gén expressziós és DNS metilációs eredmények korrelációja

Az RNS minták izolálásához RNeasy Plus Mini kitet (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) használtunk. A génexpressziós mintázat meghatározását Affymetrix Human Gene 1.0 microarray-vel (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) végeztük el. A nyers CEL dokumentumokat R v.3.2.2 szoftver segítségével elemeztük Oligo csomag használatával. A korreláció meghatározásához Pearson's korrelációs koefficienszt számoltunk a génexpressziós log2 értékek és a DNS metilációs ($\Delta\beta$) értékek között.

The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Genomikai elemzéseinket a Skin Cutaneous Melanoma (SKCM) adatbázisban található melanoma szöveti minták adataival egészítettük ki (TCGA, Provisional). A felhasznált adatok egy része a TCGA Research Network által generált eredményekből származott (<http://cancergenome.nih.gov>). Másrésről, 437 melanoma minta Illumina Methylation 450K array-ből származó metilációs értékét töltöttük le a TCGA-GDC portálról (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), melyeket az R szoftver TCGAbiolinks csomagjával és a GDCquery és GDCprepare funkcióival elemeztünk.

TaqMan assay

Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) technikával validáltuk a 18 melanoma sejtvonal array CGH eredményeit. A *GLIPR1*, *COL1A2* és *RELN* gének kópiaszámait TaqMan® Copy Number assay-vel (Applied Biosystems Inc., USA) határoztuk meg. Az assay kivitelezéséhez TaqMan® Universal PCR Master Mix-et használtunk.

Valós idejű kvantitatív PCR

A kandidáns gének relatív expressziós szintjeinek meghatározása valós idejű PCR módszerrel történt, LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) berendezéssel.

Statisztikai elemzések

SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftvert használtuk a további statisztikai elemzéseinkhez. Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk az adatok normál eloszlásának meghatározásához. Pearson's korrelációval elemeztük az array CGH és qPCR adatok közötti összefüggést. Mann-Whitney-Wilcoxon tesztet használtunk az invazív és nem invazív sejtvonalak mRNS expressziós adatainak összehasonlításához. Minden esetben a $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

A melanoma sejtvonalak genom profilja

Array CGH elemzés

A vizsgált 18 melanoma sejtvonal (12 primer tumor eredetű és 6 metasztázis eredetű) kópiaszám eltéréseit array CGH technikával határoztuk meg CytoChip ISCA arrayvel. A teljes genomot érintő nagymértékű kópiaszám variációt figyeltünk meg, mely elsősorban a 1q, 6p, 7, 8q, 17q, 20 és 22q kromoszóma szakaszokon megjelenő kópiaszám növekedésben, és a 6q, 9p és 10p kromoszóma szakaszok kópiaszám csökkenésében nyilvánult meg. Számos, a melanoma kialakulásában bizonyítottan szerepet játszó gén (pl. *NEDD9*, *EGFR*, *BRAF* és *MYC*) kópiaszám eltérését figyeltük meg.

Invazív melanoma sejtvonalak ismétlődő genetikai eltérései

Összehasonlítva az invazív (n=4) és nem invazív (n=8) primer tumor eredetű, valamint a metasztázis eredetű (n=6) sejtvonalak genom eltéréseit megfigyeltük, hogy a 7q és 12q kromoszómális régiók kópiaszám változásai kizárólag az invazív képességgel rendelkező sejtvonalakat érintették, és nem jelentek meg a nem invazív illetve metasztázis eredetű sejtvonalakban. Emellett az 5p13 és 8q24 lókuszok kópiaszám növekedése az invazív sejtek mellett a metasztázis eredetű sejtvonalakban is megjelent, olyan invázióval összefüggő géneket hordozva, mint a *GDNF* (5p13.1), *GPAA1*, *PLEC* és *SHARPIN* (8q24.3). Ezeknek az adatoknak a validálását valós idejű kvantitatív PCR módszerrel végeztük el TaqMan® Copy Number Assays használatával. Ez az elemzés a két adatsor szoros összefüggését tárta fel.

Kandidáns gének kópiaszám eltérései melanoma tumor mintákban

Az invázióval összefüggést mutató gének szerepét natív melanoma szövetekben is vizsgáltuk a Skin Cutaneous Melanoma adatbázis (TCGA, Provisional) használatával. Azon génekre fókuszáltunk (*GDNF*, *GPAA1*, *PLEC* és *SHARPIN*), melyek kópiaszám eltérést mutattak mind az invazív és mind a metasztázis eredetű sejtvonalainkban. Az említett génekre vonatkozóan kizárólag a metasztázisokban figyeltünk meg kópiaszám növekedést, szemben a primer melanoma mintákkal. Emellett a *GPAA1*, *PLEC* és *SHARPIN* gének együttes amplifikációja 26 metasztatikus melanomában is megfigyelhető volt. A *GDNF* gén amplifikációja kevesebb (n=14) metasztatikus mintában volt kimutatható.

BRAF és NRAS mutáció az invázióval összefüggésben

A *BRAF*^{V600E} mutációt hordozó sejtvonalainkban a 7q kromoszóma kópiaszám növekedését tapasztaltuk a 7q34 lókuszon lokalizálódó *BRAF* génnel együtt. Továbbá, szintén a *BRAF*^{V600E} mutációval együttesen előforduló 1q és 6p kópiaszám növekedését detektáltuk, míg a 9p és 10p régiók deléciója a *BRAF*^{V600E} vad típusú sejtvonalakat jellemezte. Emellett a 19p12 lókusz deléciója szintén csak a *BRAF*^{V600E} mutáns

sejtvonalainkban volt megfigyelhető. Az *NRAS* mutációval összefüggésben a 4q kromoszóma delécióját figyeltük meg.

A *BRAF*^{V600E} mutáns invazív sejtvonalak (WM983A és HT199) 6p25.3-p22.3 lókuszon kópiaszám növekedést mutattak, ami többek között a *RREB1* (6p25) and *NEDD9* (6p24) géneket is érintette. A vad típusú invazív sejtvonalakban (WM3211 és WM1366) a 7p kópiaszám növekedése volt a jellemző eltérés.

Szelektált invazív sejtek fenotípusos jellemzői

Az invázióval összefüggő genetikai és epigenetikai elérések további vizsgálatához létrehoztunk négy szelektált invazív melanoma sejt alpopulációt (WM983A-INV, WM1366-INV, WM3211-INV és WM793B-INV) Matrigel inváziós kamra alkalmazásával.

Az invazív sejtek morfológiája eltért az eredeti sejtvonalaktól. A szelektált sejtek szignifikánsan magasabb inváziós képességgel rendelkeztek az eredeti sejtvonalak sejtjeihez képest. Emellett a szelektált sejtek proliferációs rátája alacsonyabbnak bizonyult, bár ez az eltérés nem volt statisztikailag szignifikáns.

A szelektált invazív sejtek genetikai mintázata

Az invázióval összefüggő kromoszómális eltérések azonosítása céljából CGH array-el a 4 szelektált invazív sejtvonal (WM983A-INV, WM3211-INV, WM1366-INV és WM793B-INV) kromoszóma eltéréseit az eredeti sejtvonalak eltéréseivel hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján a szelektált invazív sejtekben az 1p, 2q és 8q kromoszóma régiók kópiaszám eltérései gyakrabban fordultak elő az eredeti sejtvonalakhoz viszonyítva.

Szelektált invazív sejtek metilációs mintázata

Az invazív képességgel összefüggő metilációs eltérések a szelektált invazív sejtekben

Összességében 1249 szignifikáns, régió szintű metilációs eltérést (DMR) mutattunk ki az invazív és az eredeti sejtvonalak között. A hipermetilált DMR régiók (n=1216) száma jóval meghaladta a hipometiláltakét (n=33), melyek összesen 8733 hipermetilált és 165 hipometilált CpG helynek feleltek meg. A szignifikánsan eltérő régiókat $\Delta\beta_{\text{mean}} > 10\%$

kritériumnak megfelelően szűkítettük a további elemzéseinkhez, aminek eredményeképpen 416 hipermetilált (384 gén) és 3 hipometilált (1 gén) régió szintű eltérést kaptunk.

A legnagyobb eltérést ($\Delta\beta_{\text{mean}} > 20\%$) mutató régió összesen 15 eltérő próbát tartalmazott, és a *BAALC* gén és annak nem kódoló RNS párjára (*BAALC-AS2*) terjedt ki. Emellett számos olyan gént is azonosítottunk a szignifikáns eltérést mutató régiók között, mint a melanomák progressziójában szerepet játszó *MITF*, *CYP27A1* és *GRIA2* gének. Útvonalelemzést alkalmazva a szignifikánsan eltérő régiókhoz tartozó génekkel összefüggésben azt találtuk, hogy hipermetiláció többek között a velőcső eredetű sejtek differenciálódásában szerepet játszó útvonalat (WP2064; *NOTCH3*, *PAX7*, *HEY2*, *MITF*, *FGFR2*, *FGFR3*, *RHOB*, *MSX2*, *TLX2* és *ZIC5*) és az aktin filamentum regulációjáért felelős útvonalat (WP51; *MOS*, *GSN*, *ACTN1*, *WASF2* és *VAV1*) érintette.

A metilációs és génexpressziós eltérések integrálása

A DNS metilációs eltérések génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatára összehasonlítottuk a DNS metilációs és a génexpressziós adatainkat. Összesen 886 szignifikáns korrelációt mutató CpG helyet azonosítottunk, melyek 392 génnek feleltek meg. Ezek közül 220 génnél találtunk negatív korrelációt, vagyis a metilációs változás ellentétes irányú volt a génexpressziós változáshoz viszonyítva; míg 172 génnél a korreláció pozitív irányú volt. Érdekes, hogy a CpG sziget “shore” régiójának hipermetilációja 4 génnél (*RHOB*, *ID4*, *ST8SIA1*, és *GRIA2*) is csökkent expresszióval társult.

Szigorúbb kritérium rendszert alkalmazva (az invazív és eredeti sejtvonalak között legalább 1x expressziós eltérés és $\Delta\beta_{\text{mean}} > 10\%$ metilációs eltérés) továbbra is a gének többségénél negatív korrelációt figyeltünk meg a metilációs és génexpressziós adatokra vonatkozóan. A hipermetiláció csökkent expresszióval társult például a *IL12RB2*, *LYPD6B*, *CHL1*, *SLC9A3*, *BAALC*, *FAM213A*, *SORCS1*, *GPR158*, *FBN1* és *ADORA2B* génekre, ugyanakkor néhány génre a korreláció pozitív volt, és a hipermetiláció megnövekedett génexpresszióval járt együtt (*MCC*, *PTCHD4*, *EGFR*, *RBP4* és *FAR2*).

Emellett 2 hipometilált gén közül az egyik csökkent (*NNMT*), a másik megnövekedett (*NBPF8*) expressziót mutatott.

Invázióval összefüggő metilációs eltérések melanoma tumor mintákban

Az invazív sejtek elemzése során megfigyelt invázióval összefüggést mutató gének metilációs eltéréseit melanoma tumor mintákon is vizsgáltuk a TCGA-SKCM adatbázisból letöltött adatok felhasználásával. Először meghatároztuk a metasztázisok (n=349) és primer melanoma minták (n=88) közötti metilációs eltéréseket, aminek eredményeként 28 közös gént találtunk, melyek átfedést mutattak a saját eredményeinkkel.

Az átfedő gének közül több olyat is azonosítottunk, melyek szerepet játszhatnak az invázióban és metasztázis képzésben, mint például a *TP73*, *HOXD13*, *PAX6*, *ITPKA*, *NR2F2*, *SLC17A7*, *SPTBN1*, *AHNAK*, *CCL23*, *NFE2L3* és *SLC9A* gének. Emellett a *CBFA2T3*, *TP73*, *CTSK*, *NAV2*, *PAX6*, *ARHGAP22*, *SDK1*, *ATP11A*, *RASA3* és *SLC9A3* géneknél a metilációs változás szignifikáns expressziós eltéréssel is együtt járt.

A primer melanoma mintákat a Clark osztályozás alapján besorolva további 448 metilációs eltérést mutató gént (1 269 próba) találtunk, amiből 18 gén fedett át a saját adatainkkal (például *MECOM*, *CHD5*, *TRIM55*, *FZD6*, *TPBG* és *TRPC4*).

Az eredményeink TCGA adatbázissal való összehasonlítása során két gén (*ARHGAP22* és *NAV2*) mind a Clark szerinti beosztás, mind a metasztázis és primer melanomák felosztása és összehasonlítása során is szerepelt a közös gének között.

DNMT, UHRF és TET enzimek expressziója a szelektált invazív sejtekben

A metilációs mintázat létrehozásában, fenntartásában és eltávolításában szerepet játszó különböző enzimek, DNS metiltranszferázok (*DNMT1*, *DNMT13A* és *DNMT13B*), ubiquitin ligázok (*UHRF1* és *UHRF2*), és metilcitozin dioxigenázok (*TET1* és *TET2*) expresszióját is vizsgáltuk a szelektált invazív sejtekben. Megfigyeltük, hogy a szelektált invazív sejtekben csökkent a *DNMT1* és *DNMT3B* gének expressziója az eredeti sejtvonalakhoz képest. Az *UHRF1* és *UHRF2* gének esetében szintén down-regulációt figyelhettünk meg az invazív sejtekben. Emellett a *TET1* és *TET2* gének szintén jelentsen

alacsonyabb expressziója jellemezte az invazív sejteket. A *TET2* gén hipermetilációját figyeltük meg a gén promóter régióján az invazív populációban.

DISZKUSSZIÓ

Az invázió – az egyik első lépése a primer tumor metasztázis képzésének – folyamatát befolyásoló genetikai és epigenetikai eltérésekről az intenzív vizsgálatok ellenére is hiányos a tudásunk.

Az melanoma sejtek invazív képességét elemezve a kísérleteink során vizsgált melanoma sejtvonalakat két csoportba soroltuk. Célunk volt az invazív és nem invazív sejtvonalak kópiaszám eltéréseinek meghatározása array CGH-el. Az invazív sejtekben számos olyan gén kópiaszám eltérést találtuk, melyek irodalmi adatok alapján fontos szerepet játszik különböző daganatok invazív képességének kialakulásában; ugyanakkor melanoma sejtek inváziójával összefüggésben ezeknek a géneknek az eltéréseit korábban nem publikálták. Az invazív sejtvonalak genetikai profiljával összefüggésben vizsgáltuk a sejtek *BRAF* és *NRAS* mutációs státuszát is. A *BRAF* mutációt hordozó és vad típusba tartozó invazív sejtvonalakat összehasonlítva azt találtuk, hogy a 6p25.3-p22.3 régió kópiaszám növekedése kizárólag a *BRAF* mutáns sejtvonalakban fordult elő. Ezen a régión lokalizálódik a melanoma progressziójában fontos szerepet játszó *NEDD9* (6p24) és *RREB1* (6p25) gén. A *NEDD9* gén amplifikációját korábbi kutatások összefüggésbe hozták a mesenchimális invázió folyamatával melanoma sejtekben, azonban a *BRAF* mutációval összefüggésben eddig még nem mutatták ki.

További vizsgálatainkhoz az invazív sejteket szelektáltuk a teljes sejtpopulációtól, majd szelektált invazív klónokat hoztunk létre. A MITF (microphthalmia-asszociált transzkripciós faktor) régóta a kutatások tárgyát képezi, mivel a melanin termelés egyik fő szabályozó molekulája és szerepet játszik az invázió mechanizmusának gátlásában valamint a proliferatív fenotípus kialakításában. Metilációs eltéréseit szintén kimutatták a melanoma tumorok agyi metasztázis képzésével összefüggésben, így valószínűsíthetően nem csupán az invázió folyamatában, de a metasztázis többi lépésében is fontos szerepet

játszik. Ezekkel a vizsgálatokkal összhangban, az általunk vizsgált szelektált invazív sejtekben is hipermetiláció jellemezte a *MITF* gént az eredeti sejtvonalakhoz viszonyítva. Emellett az útvonal elemzésünk során a hipermetilált gének a velőcső eredetű sejtek differenciálódásában szerepet játszó útvonalat (WP2064) érintették elsősorban, melynek egyik regulátora szintén a *MITF*.

A szelektált invazív sejtekben a metiláció és a génexpresszió korrelációját vizsgálva olyan potenciális DNS metilációs markereket (*TFI2*, *HCK*, *MGMT* és *TP73*) is azonosítottunk, melyeket korábbi vizsgálatokban az előrehaladott klinikai stádiummal, rövid túlélési idővel és a metasztázis meglétével összefüggésben mutattak ki melanomákban. Eredményeink szerint az említett gének a primer tumorok invazív képességének meglétére is utalhatnak.

A legújabb tanulmányok szerint a DNS hipermetilációja nem kizárólag a gén csendesítésével társulhat, hanem a géntestbe nyúlva a génexpresszió növekedését is eredményezheti. Ezt a jelenséget a szelektált invazív sejtekben mi is megfigyeltük az *EGFR* és *RBP4* géneknél, ahol a géntestbe nyúló hipermetiláció szignifikáns korrelációt mutatott a megnövekedett expresszióval. Az *EGFR* expresszió szerepe a melanomában vitatott, bár több szerző is leírja, hogy nincs egyértelmű összefüggés az *EGFR* expresszió és a melanoma klinikó-patológiai jellemzői között, ugyanakkor számos vizsgálat utal a melanoma minták *EGFR* szintjének eltéréseire.

A szelektált invazív sejtek vizsgálata során kapott eredményeink validálása céljából adatainkat a TCGA-SKCM adatbázisban nyilvánosan elérhető metilációs eredményekhez hasonlítottuk. Számos olyan közös eltérést azonosítottunk, melyek funkcionálisan hozzájárulhatnak a melanoma tumorok invazív képességéhez, köztük a *HOXD13* gén metilációs eltérését, mely gén a tumorok kialakulásában jól ismert mester regulátorként működik. A HOX gén család tagjait vizsgálva további nyolc gén (*HOXA5*, *HOXB1*, *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB4*, *HOXC5*, *HOXC9* és *HOXD11*) metilációs eltérését figyeltük meg, ami megerősíti a homeobox gének epigenetikai vizsgálatának jelentőségét a diagnózisban, a predikcióban és a prognózisban egyaránt.

A legjelentősebb eredményünk a TCGA adatbázis és a saját eredményeink összehasonlítása során két olyan gén (*ARHGAP22* és *NAV2*) volt, melyek promóter

régiójának hipermetilációja a szelektált invazív sejtvonalainkban ugyanúgy megjelent, mint az invazív melanoma tumorokban és metasztázisokban. Irodalmi adatok alapján mindkét gén szerepet játszik a különböző típusú tumorok invazív folyamatiban. A NAV2 számos funkcionális doménnel rendelkező fehérje, melyek a citoszkeletonhoz kapcsolódva vezérlik a sejtek mozgását és ezáltal az invázió és metasztázis képzés folyamatát. Emellett egy közelmúltban megjelent kutatás annak a lehetőségét is felvetette, hogy a NAV2 befolyásolhatja az epitheliális-mesenchimális tranzíciót a GSK-3 β / β -catenin-SNAI2 útvonalon keresztül. Továbbá az ARHGAP22 csendesítésével összefüggésben megfigyelték, hogy növekszik a mesenchimális fenotípusú melanoma sejtek száma, vagyis a gén a mesenchimális-amoeboid tranzíció vezérlésében játszhat szerepet. Mindkét tranzíciós folyamat hozzájárul a sejtek morfológiai változásaihoz, a külső körülményekhez adaptálódva biztosíthatják a sejtek mozgását, invázióját, ezáltal megteremthetik a metasztázis képzés feltételeit. Eredményeink alapján az ARHGAP22 és NAV2 gének metilációs eltérései a génexpressziós változásokkal társulva befolyással lehetnek a primer melanoma tumorok invazív képességére és metasztázis képzésére.

FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS EREDMÉNYEK

A doktori disszertáció fő célja olyan genomikai eltrérések (kromoszóma kópiaszám változások, DNS metilációs és génexpressziós eltérések) azonosítása volt, melyek a melanoma sejtek inváziójával állnak összefüggésben.

A kromoszóma kópiaszám változások kapcsolatának vizsgálata a melanoma sejtek invazív képességével:

- A *GDNF* (5p13.1), *GPAA1*, *PLEC* és *SHARPIN* (8q24.3) gének amplifikációja sziginifikánsan gyakrabban fordult elő a primer eredetű invazív sejtvonalakban a nem invazívakhoz viszonyítva, és emellett a metasztázis eredetű sejtvonalakat is jellemezte, ami feltételezi ezen eltérések szerepét a metasztázis képzésben.

A kópiaszám változások kapcsolatának vizsgálata a *BRAF* és *NRAS* mutációkkal invazív sejtvonalakban:

- A 6p25.3-p22.3 régió amplifikációja kizárólag a *BRAF* mutációt hordozó invazív melanoma sejtvonalakban jelent meg, mely lókuszon a *NEDD9* (6p24) és *RREB1* (6p25) gének is lokalizálódnak.

Az invazív képességgel összefüggő genetikai és epigenetikai eltérések vizsgálata szelektált invazív melanoma sejtekben:

- Az invazív sejtekben hipermetilált mintázatot mutattak az eredeti sejtvonalakhoz viszonyítva.
- Az invazív sejteket a velőcső eredetű sejtek differenciálódásában szerepet játszó útvonal génjeinek, köztük a *MITF* génnek a hipermetilációja jellemezte.
- A metilációs és génexpressziós eredmények integrálásával az invazív sejtekben számos gén hipermetilációja csökkent expresszióval társult.
- A géntestbe nyúló hipermetiláció megnövekedett génexpresszióval társult az *EGFR* és *RBP4* gének esetében a szelektált invazív sejtekben.

Az invázióval összefüggő eltérések validálása melanoma tumor mintákon:

- Az *ARHGAP22* és *NAV2* gének promóter metilációja egyaránt jellemezte az invazív primer melanoma tumorokat és a metasztázisokat.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az invazív sejtek kópiaszám változásai lehetőséget adnak új kandidáns gének vizsgálatára irányuló funkcionális kutatásokhoz. Emellett eredményeink rámutatnak az invazív sejtek hipermetilációs mintázatának jelentőségére, mely összefüggésben állhat a melanoma sejtek invazív tulajdonságával.



Nyilvántartási szám: DEENK/14/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Koroknai Viktória
Neptun kód: EBWBZY
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044575

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Koroknai, V.**, Szász, I., Hernandez, V. H., Fernandez, J. N., Cuenin, C., Herceg, Z., Vízkeleti, L., Ádány, R., Ecsedi, S., Balázs, M.: DNA hypermethylation is associated with invasive phenotype of malignant melanoma.
Exp. Dermatol. [Epub ahead of print], 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14047>
IF: 2.868 (2018)
2. **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

További közlemények

3. 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: 2.381 (2018)
4. Balázs, M., **Koroknai, V.**, Szász, I., Ecsedi, S.: Detection of CCND1 Locus Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization.
In: The Retinoblastoma Protein. Ed.: Pedro G. Santiago-Cardona, Springer Science+Business Media, New York, NY, 85-100, 2018.





5. 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
6. 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
7. 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
8. Vízkeleti, L., Ecsedi, S., Rákossy, 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: 19,677

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,483**

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, 2020.01.16.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönöm Dr. Ádány Róza egyetemi tanárnak, hogy tanulmányaimat MTA Népegészségügyi Kutatócsoport kereteiben végezhettem és munkámat folyamatosan támogatta.

Köszönöm a kísérletek, elemzések során nyújtott kiemelkedő segítségét Szász Istvánnak, Kiss Tímeának és Dr. Ecsedi Szilviának.

Köszönöm a támogatását Népegészségügyi Kar Megelőző Orvostani Intézet munkatársainak, különösen Kovács Györgyné asszisztensnek.

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

Munkámat támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K112327), GINOP-2.3.2-15-2016-00005 projekt és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3 és ÚNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program. A munka az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.