

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

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

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés (témaválasztás és célkitűzés).....	5
2	Irodalmi áttekintés	8
2.1	Melanoma malignum	8
2.1.1	Előfordulás	8
2.1.2	Diagnózis, osztályozás.....	10
2.1.3	Stádiumok, kezelés, kilátások	11
2.1.4	Aetiologiai faktorok, a melanoma progresszió modellje, a melanoma malignum biológiája 12	
2.2	Notch-1 receptor.....	16
2.2.1	A Notch-1 receptor szerkezete, működése, target gének, ligandjai	16
2.2.2	A Notch receptor működésének szabályozása	19
2.2.3	A Notch aktivációval összefüggésbe hozott intracelluláris jelátviteli rendszerek	19
2.2.4	A Notch receptorok fiziológias funkciója	20
2.2.5	Notch receptorok szerepe pathológiás folyamatokban	20
2.3	β-katenin	23
2.3.1	Szerkezete, funkciója	23
2.3.2	A β -katenin működésének szabályozása	24
2.3.3	β -katenin jelentősége malignus megbetegedésekben	25
3	Anyagok és módszerek.....	25
3.1	Reagensek, antitestek:	25
3.2	Sejtenyésztés:	26
3.3	Sejtdhézió vizsgálata	26
3.4	Három-dimenziós szferoidok növekedésének vizsgálata agarban:	27
3.5	Western (immuno) blot és immunhisztokémia:	27
3.6	Real-time PCR és szemi kvantitatív PCR:.....	28
3.7	Sejtnövekedés és apoptózis mérése:.....	29
3.8	Kolónianövekedés agarban (soft agar colony formation assay)	29
3.9	Rekombináns adeno-, retro- és lentivirális vektorok létrehozása	29
3.10	A célsejtek vírusvektorral való megfertőzése	31
3.11	Állatkísérletek	31
3.12	Luciferáz vizsgálat	32
3.13	Statisztikai módszerek.....	32
4	Eredmények.....	33
4.1	Notch-1 receptorok expressziójának összehasonlítása naevus pigmentosus és melanoma malignumból nyert betegmintákon	33

4.2	Notch-1 receptor és a „target” gének expressziója különböző növekedési fázisból származó humán melanoma sejtvonalakon és melanocitákon	34
4.3	A Notch útvonal működésének gátlása humán melanoma (RGP, VGP, Met) és melanocita sejtvonalakon	36
4.3.1	A receptor aktivációjának visszaszorítása farmakológiai inhibitorral a γ -szekretáz enzim gátlásával	36
4.3.2	A receptor indukálta transzkripció gátlása MAML-1 transzkripciós regulátor blokkolásán keresztül	37
4.4	Notch receptor konstitutív aktivációja humán melanoma sejtekben.....	38
4.4.1	Permanens Notch-1 receptor aktiváció előidézése a célsejteken	38
4.4.2	Az állandó génaktiváció <i>in vitro</i> hatása.....	39
4.4.3	A konstitutív Notch aktiváció hatásának vizsgálata <i>in vivo</i> , a SCID egér modell segítségével	44
4.5	Notch receptor aktiválódásának hatása a β-katenin molekula stabilizációjára	46
4.5.1	A β -katenin fehérje expressziója Notch aktivációt követően	46
4.5.2	A Notch-1 receptor aktiváció gátlásának hatása a termelődő β -katenin szintjére.....	47
4.5.3	A termelődött β -katenin fehérje funkcionálisan aktív	47
4.6	β-katenin szupressziójának hatása a humán melanoma sejtek növekedésére <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>.....	48
4.6.1	Kis interferáló RNS lenti-vírus vektor létrehozása.....	48
5	Megbeszélés.....	51
5.1	A funkcionálisan aktív Notch-1 receptorok expressziójának vizsgálata, humán melanocita és melanoma sejtvonalakon, illetve humán naevus pigmentosus és melanoma malignum szövetmintákon.	51
5.2	A Notch-1 receptor gátlása, és a gátlás utáni hatás tanulmányozása a melanoma sejtek növekedésére <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>.....	52
5.3	A funkcionálisan aktív Notch-1 receptor emlős expresszióra alkalmas vektor konstrukciójának, és rekombináns lentivírus konstrukciójának előállítása. A Notch-1 aktív formájának overexpresszálása humán melanoma és melanocita sejtvonalakon.	55
5.4	A Notch-1 túlzott mértékű expressziója (overexpresszió) általi hatás vizsgálata a melanoma sejtek proliferációjára, illetve kihorgonyzás-független növekedésére. A konstitutív Notch aktiváció hatásának vizsgálata <i>in vivo</i>, SCID-egér modellen.	56
5.5	A Notch-1 overexpresszió hatásának tanulmányozása a sejtadhézióra, egyes adhéziós molekulák expressziójára, valamint apoptózisra háromdimenziós szferoid modellen.....	57
5.6	A Notch-1 overexpresszió hatásának tanulmányozása a β-katenin fehérje (mint lehetséges „downstream” target molekula) szintjére.	58
5.7	A β-katenin molekula expressziójának gátlása, és a sejtproliferációra, apoptózisra és tumorgenezisre kifejtett hatás tanulmányozása a permanensen aktív Notch-1 receptorral rendelkező melanoma sejtekben.	60

5.8	A Notch jelátvivő útvonal modulálásának lehetőségei és esélye	61
6	Új megállapítások.....	63
7	Összefoglalás.....	64
8	Summary.....	65
9	Irodalmi hivatkozások jegyzéke.....	66
10	Tárgyszavak:	72
11	Köszönetnyilvánítás.....	73
12	Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények listája.....	74
13	Függelék (In extenso közlemények).....	77

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke:

2-ME: 2-merkaptó-etanol

c-KIT: Stem cell factor receptora

DAPT: N-[N-(3, 5-difluorofenacetil-l-alanil)]-S-fenilglicin t-butil észter

DMEM: Dulbecco modified Eagle's Medium

DMSO: di-metil-szulfoxid

DN: domináns negatív

DN-MAML1: domináns negatív mastermind-like-1

EDTA: etilén-diamin-tetraecet sav

EGFP: enhanced GFP

E-kad: E-kadherin (epiteliális forma)

FAK: fokális adhézions kináz

FBS: fetal bovine serum, magzati borjúsavó

GFP: zöld fluorescens fehérje

H&E: hematoxylin-eosin

H1UG: H1 promoterrel rendelkező lentiviral plasmid

HES: hairy and Enhancer of split [E(spl)]

HEY: hairy and Enhancer of split [E(spl)] related with yrpw motif

HRP: tormaperoxidáz

IgG: immunoglobulin

IGF: inzulin-szerű növekedési faktor

kDa: kilo Dalton

LacZ: β -galaktozidáz

mAb: monoklonális antitest

Mel-CAM: melanoma-cell adhesion molecule, MUC18, CD146, endoszialin

Met: metasztázis

MITF: microphthalmia associated transcription factor

N^{IC}: intracelluláris Notch, a Notch receptor funkcionálisan aktív formája

OD: optikai denzitás

N-kad: N-kadherin (nerurális forma)

PBS: foszfát puffer

pFAK: foszforilált (aktív) FAK

PI: propidium jodid

Q-PCR: kvantitativ polimeráz lánc reakció

Real-time PCR: lsd. Q-PCR

RGP: radiális növekedési fázis

RNS: ribonukleinsav

SCID: severe combined immunodeficiency, súlyos kombinált immunhiányos betegség

SD: standard deviáció

SDS: Nátrium-dodecil-szulfát

siRNS: kis interferáló RNS

ssDNS: egy szálú DNS (single stranded)

SUP-T1: T-sejtes leukémia sejtvonal

TBS-T: Tris alapú sóoldat+Tween20

TCF: T-cell factor, génszakasz

TRIS: trisz(hidroximetil)-aminometán, (HOCH₂)₃CNH₂, puffer oldat alapja

VGP: vertikális növekedési fázis

1 Bevezetés (témaválasztás és célkitűzés)

A halálozási statisztikákban a rosszindulatú megbetegedések szerepelnek a második helyen a szív- és érrendszeri megbetegedések után. Az Európai Unióban az összes daganatos eset okozta halálozás csökkenő tendenciát (10%) mutat az 1980-1995 évi adatok alapján [1]. Magyarországon a statisztikák szerint 1975 és 1995 között csökkent a rosszindulatú daganatok okozta halálozás növekedési üteme. Ennek eredményeképpen 1995 és 2002 között a halálozások száma állandósult [2]. Ezzel egyidőben egyes ráktípusok, mint például a melanoma malignum – a bőr pigmenttermelő sejtjeiből kiinduló rosszindulatú daganat - incidenciája továbbra is növekszik világszerte (World Health Organization, 2005). Ez a növekedés -melanoma esetében 3%- becslések szerint 15 évenként megduplázódik. A melanoma malignum korai felismerésével és az időben elvégzett korrekt 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 betegek várható túlélési esélyének javításához új terápiás eszközökre van szükség. Ezek kifejlesztése érdekében további kutatások szükségesek a betegség patomechanizmusának, a progresszió és metasztatikus szóródás lépéseinek részletesebb megismeréséhez.

A molekuláris biológiának az elmúlt 15 évben végbement fejlődése: a humán genom megismerése, a virális vektorok létrehozása klónozással, a génterápia, a cDNA alapú array nagyon jó lehetőséget teremtettek arra, hogy a sejteken belüli folyamatokat, és azok szabályozását összefüggéseiben, avagy egyetlen gént kiemelve, annak szerepét izoláltan, részleteiben tanulmányozhassuk.

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 a melanoma sejtek biológiájával kapcsolatos ismereteink a

mai napig nem teljesek. Az elmúlt évtizedekben egyre több, korábban kevésbé ismert, és értett sejten belüli szabályozó mechanizmus, sejtfelszíni receptorcsalád, valamint jelátvivő rendszer került felfedezésre, illetve más megvilágításba az új kutatási módszereknek köszönhetően. Egy ilyen, eddig kevésbé ismert receptorcsalád a Notch receptorok csoportja.

A Notch-receptorok transzmembrán fehérjék, amelyek eredetileg az embrionális fejlődésben vesznek részt, és amelyekről időközben kiderült, hogy jelentős szereppel bírnak a rosszindulatú megbetegedések kialakulásában is. A 90-es évek elején kimutatták, hogy a T-sejtes leukémiás esetek jelentős részében egy transzlokációnak köszönhetően a Notch-1 receptor permanensen aktiválódott, ami a T-limfociták kontrollálatlan növekedését okozza. 2000 körül jelentek meg az első olyan tudományos közlemények, amelyek a Notch-1 receptorokat szolid tumorok kialakulásával, (elsősorban tüdő, cervix, vese eredetű megbetegedésekkel) hozták összefüggésbe. Mivel a Notch receptorok jelentőségével melanoma malignumban a munkám kezdetekor semmilyen tudományos közlemény nem foglalkozott, PhD dolgozatom témájaként a Notch-1 receptorok szerepének vizsgálatát tűztük ki.

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 a tüdőmetasztázis-képzésben. Kísérleteinkkel szeretnénk 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 konstrukcióinak, és rekombináns lentivirális konstrukcióinak előállításának. A

Notch-1 aktív formájának nagymértékű expresszállása 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 adhézións 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 Irodalmi áttekintés

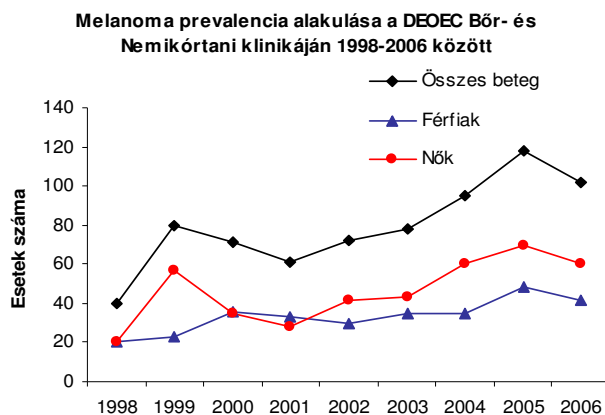
2.1 Melanoma malignum

2.1.1 Előfordulás

A melanoma malignum a bőr neuroektodermális eredetű pigment termelő sejtjeiből, a melanocitákból kiinduló rosszindulatú daganat. A primer tumor előfordulási helye a bőr, a nyálkahártyák, uvea, és a leptomeninx, amelyek közül a bőr a leggyakrabban érintett szerv (90%).

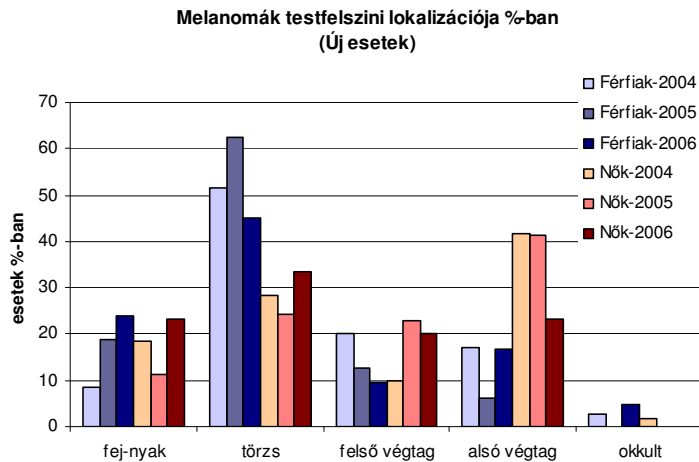
A világ adatait nézve (2000-es évben) az új melanomás esetek 100,000 főre eső előfordulása 0.2-34.9 között változik. Ausztráliában és Új-Zélandon a legmagasabb az előfordulás (40.5, illetve 36.5/100,000 férfiak esetében), amit Norvégia és az USA követ 14.1/100,000, illetve 13.3/100,000-el. Az incidencia Kínában (0.2/100000) és Japánban (0.4/100000) a legalacsonyabb [3]. A betegség incidenciája Magyarországon 7.6/100,000, a betegség okozta halálozás pedig 1.6/100.000. (WHO)

Magyarországon 2001-ben 517 férfi és 600 női betegnél, 2005-ben 825 férfi és 1003 női betegnél diagnosztizáltak új melanomás megbetegedést [4] A férfi és női, együttes melanoma eredetű halálozás 1999-2004 között évi 315-344 között változott (KSH adatai). A melanomás esetek előfordulása folyamatosan nő. A 35 év alatti férfiak esetében az ötödik, nőknél a 3. leggyakoribb rosszindulatú daganat. [5]



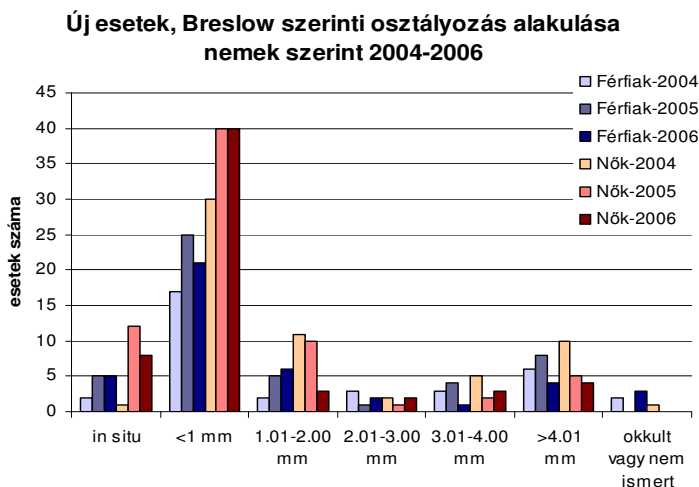
1.Ábra: A melanoma incidencia alakulása a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikáján 1998-2006

A Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centruma Bőrgyógyászati Klinikáján az új melanomás esetek száma 1999 és 2006 között 80 és 118 között változott. A 2000-es és 2001-es évet leszámítva -az országos adatoknak megfelelően- női dominancia volt megfigyelhető. (1. Ábra)



2.Ábra: Az új melanomás esetek testfelszíni lokalizációjának megoszlása nemek szerint a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikáján 2004-2006.

A melanoma leggyakoribb kialakulási helye a férfiak esetében a törzs, míg a nőknél az alsó végtag. (2. Ábra, Hunyadi et al, 2007) Ennek magyarázata a fényexpozíció, és az eltérő öltözködési szokások. Az új esetek 53-80%-ában a tumorvastagság 1 mm alatti (3. Ábra). Az in situ és a <1mm-es esetek aránya 2003 után folyamatosan nőtt az összes esethez képest, ezzel egyidőben fokozatosan csökkent a >1mm feletti tumorok aránya az észlelés időpontjában.



3.Ábra:

Az új melanomás esetek Breslow szerinti osztályozása nemek szerint bontva. A DEOEC Bőrgyógyászati Klinikájának statisztikai adatai 2003-2006

2.1.2 Diagnózis, osztályozás

A betegség pontos diagnózisát a klinikai vizsgálat és a szövettani prognosztikus paramétereket tartalmazó, pontos hisztopatológiai lelet birtokában lehet kimondani.

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 bőrfelszínen jelentkezik. Az acralis lentiginosus melanoma (ALM) tenyéren, talpon és subungualis lokalizációban fordul elő. Ritkább altípusok a desmoplasticus melanoma, a neurotrop melanoma, a kék naevus talaján, illetve a congenitalis naevus talaján kialakult melanoma, valamint a naevoid melanoma. Melanoma kialakulhat még az uvea-n, és a nyálkahártyák különböző területein, mint pl. a vulva, vagina, szájüreg, anorektum, orrüreg, esophagus. Jóllehet a 4 fő altípus szövettanilag és klinikailag különbözik, ennek a felosztásnak mégis prognosztikai értéke. A primer melanomák leghasznosabb prognosztikai indikátorának a *Breslow* féle tumor vastagság értéket, és az ulceráció meglétét vagy hiányát tartják. Egyéb - szövettani vizsgálat során nyerhető - prognosztikai faktor még az invázió mértéke (*Clark I.-V.*), a növekedés fázisa, a tumor mitotikus rátája, a regresszió, a tumort infiltráló limfociták mértéke[6], mikroszkópos szatellita metasztázis jelenléte, az érinvázió, a perineurális terjedés, a sejttípus, illetve a sebészi szélek érintettsége. Fontos prognosztikai értékkel bírhat még az őrszem nyirokcsomó (sentinel node) -biopszia eredménye, amely a mikroszkópikus nyirokcsomó érintettségéről tájékoztat.[7] Az elmúlt évtizedekben végzett molekuláris szintű kutatások eredményeinek tumor markerként vagy prognosztikai indikátorként való felhasználása a klinikumban sajnos nem járt kézzel fogható eredménnyel. A kis esetszámú vizsgálatokban ezek a molekuláris markerek ígéretesnek tűnnek, de amikor nagy beteg populáción kerül sor a vizsgálatukra, ezen markerek többsége klinikailag használhatatlannak bizonyul. Ennek oka az lehet, hogy a melanomák nagyon heterogének és nincs igazából olyan klasszifikációs rendszer, amely megengedné a molekuláris markerek használatát.

2.1.3 Stádiumok, kezelés, kilátások

A daganatok, így a melanoma malignum felosztása a klinikus számára nélkülözhetetlen a betegség prognózisának meghatározásában, és az ennek megfelelő leghatékonyabb terápiás terv felállításában.

Az 2002-ben az AJCC (American Joint Commission on Cancer) egy tumor-nyirokcsomó-metasztázis (TNM) osztályozási rendszert hozott részre. A jelenlegi TNM-klasszifikáció szerint a tumorok besorolásának fő szempontjai a A) tumorvastagság, és az exulceráció, B) regionális nyirokcsomók érintettsége (a mikro- és makrometasztázisok száma), illetve C) távoli áttétek megléte és azok lokalizációja. Az AJCC tumorvastagság alapján a következő csoportokba osztotta a melanoma malignumos eseteket: T1: tumorvastagság <1mm, T2: 1-2mm, T3: 2-4mm, T4: >4mm. Ezen kívül „a” jelzi a nem ulcerálódott tumor, „b” exulcerálódott tumort. A T1a, T1b, T2a, T2b stádiumokban az 5 éves túlélés 95%-40%. [8]

Az ehhez kapcsolódó besorolás, a klinikai stádiumbeosztás a TNM rendszer alapján egységes prognosztikai csoportokba osztja az eseteket I-IV stádiumig. Az I-es (szövettanilag alacsony(A) vagy mérsékelt(B) rizikójú), és II-es (szövettanilag magas rizikójú) stádiumban a tumor lokalizált, a III-as stádiumban nyirokcsomó-érintettség, a IV-es stádiumban távoli áttét jellemzi az eseteket. IV-es stádiumban az 5 éves túlélés <25%. [8]

A melanoma kezelésének legfontosabb része minden esetben a sebészi eltávolítás, illetve az ezt követő gondos utánpótlás. Az I-es stádiumú esetek egy (szerencsés) részében a primer tumor széles kimetszése teljes megoldást nyújthat. Ha a tumor exulcerált, elektív nyirokcsomó-eltávolítás (SNB), illetve terápiás-palliatív nyirokcsomó eltávolítás javasolt. Metasztázis megléte esetén mono- (DTIC, mustarnitrogén, platinasók) vagy kombinált kemoterápia javasolt (BOLD, DVP, DTIC-mustarnitrogén). Palliatív célból, a tumormassza csökkentésére sugárkezelés végzése is szóba jöhet. Újabb típusú terápiás megoldást jelentenek az immuno-kemoterápiás: Interferon alfa + citosztatikum (DTIC, platinasók), valamint az immunmoduláns kezelések is (Interferon-alfa, IL-2). [9] Kísérleti fázisban lévő therápiás lehetőségek (a teljesség igénye nélkül): tumor vakcináció (dendritikus

sejttel[10], szintetikus peptiddel [11]) T-sejt kezelés adoptív transzferrel[12], anti-angiogenetikus therápia (anti-VEGF antitest [13]).

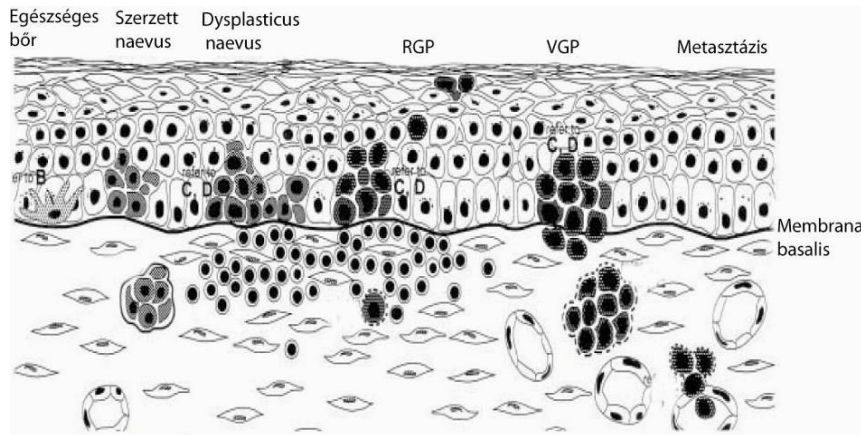
A melanoma malignum kiemelkedő áttétképzési tulajdonságokkal rendelkezik. A diagnózis felállításakor a még csak primer daganattal jelentkező betegeknél a későbbi kórlefolyás során 15.5%-35.9%-ban észlelnék kiújulást. [14, 15] Az áttetek aránya a tumorvastagságtól függően eltéréseket mutat. A Semmelweis Orvostudományi Egyetem Bőrgyógyászati klinikájának adatbázisa szerint az 1979-2000 között észlelt 210 metasztázis 6.5%-a a <0.75mm tumoroknál, 17%-a 0.75-1.5mm közötti, 29.6%-a 1.51-4.0mm közötti, 49.2% pedig 4 mm-nel vastagabb daganattal felismert betegcsoportban lépett fel. [16] Melanomáknál az áttetek kb. 2/3-a a primer tumor felismerését követő első 3 évben kialakul [14, 15, 17]. A metasztázisok egy jelentős része az 5-10 évig terjedő időszakban (kb 7-8%), illetve 10 év elteltével lép fel. (kb 5-6%). Az áttétképzés sajátos dinamikája miatt a betegeket egész életükön át célszerű gondozni.

2.1.4 Aetiologiai faktorok, a melanoma progresszió modellje, a melanoma malignum biológiája

A melanoma kialakulásához a melanocita sejtekben bekövetkező, a környezeti faktorok által indukált genetikai kontroll mechanizmusok károsodása vezet. Epidemiológiai adatok alapján az UV sugárzást, ezen belül is az UVA-t (320-400 nm) és az UVB-t (260-320 nm) tartják a sporadikus melanomák kialakulásában a leggyakoribb kóroki tényezőnek. Ritka esetben a melanoma genetikailag öröklődhet, mint pl. a familiáris, atípusos multiple melanoma (FAMMM) szindrómában, ahol a INK4/p16 (CDKN2A) gén mutációja vezet generációkon keresztül daganat kialakulásához [18].

A melanoma kialakulása egy több lépcsős biológiai folyamat, amelynek lépéseit a 4.sz ábra szemlélteti. Ezen, Clark [19] által kidolgozott modell alapján a melanoma leggyakrabban a naevus talaján fejlődik ki, majd a radiális növekedési fázist (RGP) és vertikális növekedési fázist (VGP) követően metasztázisok (Met) kialakulása jöhet létre. A radiális növekedési fázisban az epidermisben, illetve a dermisben 10-15-nél kevesebb daganatsejtből álló invazív komponens van jelen.

Vertikális növekedési fázisban az invazív sejtek a dermális és egyéb, megváltozott mikrokörnyezetben proliferációra, tumorképzésre képesek. Metasztázis leggyakrabban a régióális nyirokcsomókban jelentkezik, ezt követik a távoli metastázisok a tüdőben és az agyban.



4.Ábra:

A melanoma progresszió modellje Clark szerint (Hsu M-Y közleménye után módosítva [20])

A malignus tumorok egy több faktor által kiváltott, több lépéses folyamat (genetikai és epigenetikai változás) eredményeképpen jönnek létre. A malignus sejtekre jellemző leglényegesebb eltérések a következőkben foglalhatók össze: korlátlan osztódási aktivitás, a programozott sejthalálra való érzékenység elvesztése, a szöveti invázió és metastázis képzésének képessége, a sejtnövekedést kontroll alatt tartó szignálokra való inszenzitivitás, az angiogenezis serkentésének képessége, valamint a sejt saját növekedését fokozó mechanizmusainak bekapcsolása. [21] A rákos transzformációhoz vezető legfontosabb genetikai szintű „támadások” a sejtciklust és annak szabályozását (ciklinD1, retinoblasztóma gén, p16, p53, c-Myc, telomerázok), az apoptózis folyamatát (Bcl-2, Apaf-1, p53), a sejtadhéziós molekulákat (integrinek, ICAM-1, MCAM, kadherineket), az inváziót elősegítő sejt felszíni proteolízis folyamatát (matrix metaloproteinázok), a kromatin szerkezetét és működését (hisztion deacetilázok, DNS repair), valamint a jelátvivő útvonalakat (pl. tirozin kináz receptorok) érintik.

Számos molekuláris útvonal vesz részt a melanoma keletkezésében és fenntartásában. 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, retinoblasztoma útvonal, p53 útvonal, sejtciklus rendszere, PI3Kináz útvonal, MITF, valamint a c-KIT [22, 23].

2.1.4.1 Onkogének, tumorszupresszorok

A karcinogén faktoroknak való krónikus kitettség, a mutációk felhalmozódása, és a malignus sejtek klonális szelekciója általában néhány évtized alatt vezet rák kialakulásához. A rák keletkezésével összefüggésbe hozható fehérjéket kódoló géneket -funkció alapján- két alapvető csoportba: onkogének és tumorszupresszorok sorolhatjuk. A túlműködésük révén rákot előidéző onkogének tipikus példája a ras onkogén, a deléciója révén tumort okozó tumorszupresszoroké a p53. A melanoma kialakulásában részt vevő, eddig felderített, lényegesebb onkogének: N-ras, B-Raf, ciklin D1/CDK4, WNT5A, p27, Cdk2, c-Myc. A melanoma kialakulásával leggyakrabban összefüggésbe hozott tumorszupresszor-gének: a p16(INK4A), p14(ARF), PTEN/AKT, és p53/Apaf-1[23, 24].

2.1.4.2 Az adhéziós molekulák szerepe a melanoma progressziójában

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.[25] A sejt-sejt, illetve a sejt-extracelluláris mátrix 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. Az egészséges sejtek adhéziós képességének a megváltozása megnövekedett sejtmotilitáshoz és a sejtek potenciálisan invazívabb viselkedéséhez vezethet, ami fontos lépést jelent a rák kialakulása felé. A metasztázist is tulajdonképpen a sejtadhézió hiánya idézi elő, aminek következtében a tumorsejtek elhagyják a szervet, amelyből származnak, és más távolabbi szervben mint pl. nyirokcsomó, máj, tüdő, agy telepednek meg.

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 sejtfelszíni adhézión fehérjék repertoárja lényegesen megváltozik. Ismeretes, hogy a leglényegesebb változások az E- és N-kadherin (Ca^{2+} függő sejtadhéziós molekulák), Mel-CAM és az $\alpha\beta 3$ integrin (vitronectin receptor) molekulákat érintik. A melanociták malignus transzformációjakor, azokon az E-kadherin helyett N-kadherin jelenik meg (E: epithelialis, N: neurális forma). Ez kadherin-„csere” teszi lehetővé az epidermisben található melanociták számára a keratinociták által fenntartott, szoros növekedési kontroll alól való kiszabadulást. Ezáltal a kadherin-„csere” a sejt migráció fokozódását, a sejtek túlélőképességének és metasztatikus hajlamának a növekedését eredményezi. [26, 27] Ismeretes pl. hogy az E-kadherin expresszió elvesztése NF κ B indukciójához vezet melanocitákban, ami a transzformálódott melanoma sejtek sajátossága [28].

A Mel-CAM adhézión fehérje a melanoma-endotheliális sejtek közötti, valamint a melanoma-melanoma sejtek közötti interakcióban vesz részt [29, 30], azonban más típusú malignomákban pl. Kaposi sarcoma, leiomiosarcoma, choriocarcinoma is kimutatták a jelenlétét. 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 agresszióját, 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. [31, 32] Ezen eredmények azt mutatják, hogy a Mel-CAM molekula fontos résztvevője a melanoma progrediálását előidéző folyamatnak.

Az integrinek heterodimer glikoprotein molekulák, amelyek egy α és egy β alegységből állnak. Funkciójuk -a sejt-sejt kapcsolódáson kívül- a sejteknek az extracelluláris matrixhoz való kihorgonyozása, ezen keresztül az „inside out”, azaz a sejtől a környezet felé kifejtett kommunikáció kivitelezése. Az integrin molekulák altípusai közül az $\alpha\beta 3$ és $\alpha 4\beta 1$ esetében mutatták ki eddig, hogy jelenlétük rossz klinikai prognózissal hozható összefüggésbe melanoma malignumos esetekben [33]. Az $\alpha\beta 3$ jelenleg a legjobb olyan molekuláris szintű marker, amely az RGP $\rightarrow$ VGP

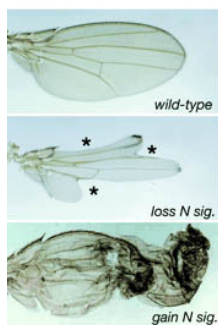
átmenetet jelzi. Egérkísérletekben $\alpha\beta3$ fehérje expressziója a radiális fázisú melanomasejteket invazívabbá, agresszívabbá teszi, illetve megvédi a sejteket az apoptózistól, fokozza a proliferációt, és a sejtmigrációt.[33]

Egyre több tény támasztja alá a feltevést, hogy a 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 adhézios kinázok* (FAK) és Akt-1 működésében változás következik be [34, 35]. Az adhézios molekuláknak számos más típusa is ismeretes, amelyek számos sejtfunkciót szabályozhatnak, és közrejátszhatnak egymás működésének modulálásában is.

2.2 Notch-1 receptor

2.2.1 A Notch-1 receptor szerkezete, működése, target gének, ligandjai

A konzervatív struktúrájú sejtfelszíni receptorokat kódoló Notch géncsaládot 90 éve fedezték fel [36]. Nevüket egy véletlenül kialakult, mutáns *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) fenotípusról kapták, ahol a Notch génnel nem rendelkező muslicák szárnyán hasítás volt látható (Notch = bevágás).

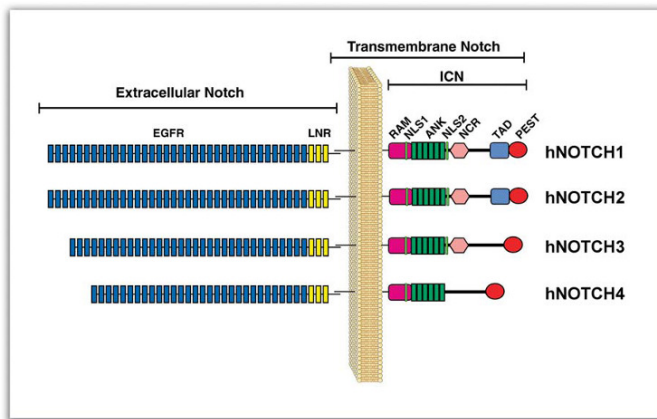


5.Ábra: A Notch receptorok működése fontos az acetmuslica normális fejlődésében. Felső kép: Vad típusú muslicában a szárny egészséges. Középső kép: Notch hiányában a szárnyon bevágások jelentkeznek, a széli rész nem fejlődik ki. Alsó kép: Notch receptor túlműködése esetén (itt: nagy mennyiségű Delta ligand esetén) a szárny túl nagyra nő. [37]

Később kiderült, hogy a Notch gének teljes (mindkét alléljének) elvesztése az egérembriók korai elhalásához vezet, valamint, hogy a Notch-receptorok öröklődésének genetikai szabályozása nagyon komplex. Ennek köszönhetően a Notch gének hamar a tudományos érdeklődés középpontjába kerültek.

A Notch gén egy szabályozó jelrendszert működtet az élő szervezetben. Ezen jelátviteli útvonal egyes elemeinek szerkezete a törzsfejlődés 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, ennek megfelelően egy, a ligand kötődésére szolgáló, nagyméretű extracelluláris doménnel, egy transzmembrán doménnel, és egy a szignáltranszdukcióban közvetlenül is részt vevő intracelluláris doménnel rendelkeznek. Az extracelluláris domén változó számú, epidermális növekedési faktor (EGF)-szerű ismétlődő motívumot tartalmaz, amely létfontosságú a receptor-ligand interakció létrejötté szempontjából.

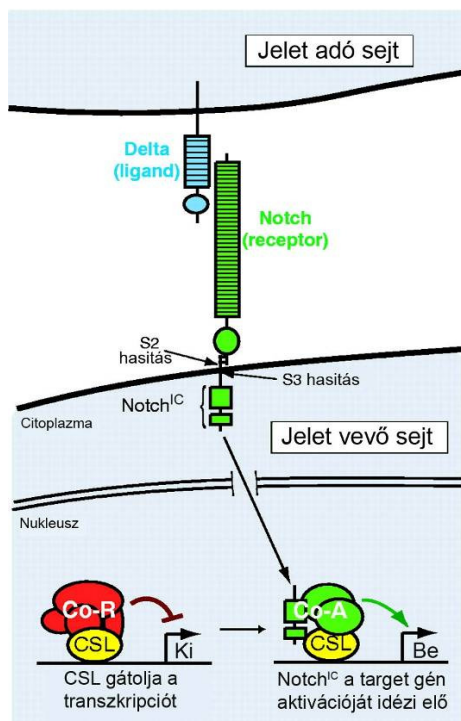


6.Ábra: A Notch receptorok típusai és szerkezetük. [38]

Leírás a szövegben.

Az egyes Notch receptorok szerkezetében a legnagyobb különbséget a TAD domén mutatja [39]. A Notch receptorok egyetlen fehérjéből álló prekursor molekulaként termelődnek, amely egy 3 lépéses aktiválási-érési folyamaton megy át. Az első lépésben - miközben a prekursor a sejtfelszín felé szállítódik -, a Golgi-ban furin konvertázok hasítják az S1 helyen (7.Ábra), lehetővé téve, hogy a receptor heterodimerként kerülhessen a sejtfelszínre. A második lépés a ligand kötődésekor következik be, amikor ADAM metalloproteázok, mint pl. TACE (ADAM17), vagy Kuzbanian hasítják az extracelluláris domént az S2 helyen, a transzmembrán doménhez közel. Az utolsó, 3. lépés a transzmembrán doménban történik, ahol a γ -szekretázok (egy négy membránfehérjéből: preszenilin, nikasztrin, Aph-1 és Pen-2-ből álló komplex) lehasítják, ezáltal felszabadítják, majd útnak indítják a Notch intracelluláris doménját (NIC) a sejtmag felé [40]. A nukleuszba bejutva a NIC a RAM23 doménen keresztül a CSL transzkripciós faktorhoz kapcsolódik (a humán változat neve CBF1, az egéré pedig RBPJK), és különböző gének transzkripcióját indítja be. Notch aktiváció hiányában a CSL fehérjék a különböző gének promoterein „ülnek”, és az odavonzott hiszton-deacetiláz, valamint egyéb ko-represszorok révén meggátolják azok transzkripcióját. Ilyen ko-represszorok lehetnek pl. a SMRT/NcoR

[41] és SHARP/MINT/ SPEN [42]. A NIC kapcsolódása a CSL fehérjéhez a ko-represszorok ko-aktivátorral való helyettesítését idézi elő (mint pl. Mastermind-Like-1 (MAML-1) [43], és a hiszton acetil-transzferáz).



7.Ábra: A Notch receptorok működése, az aktiváció lépései. Sematikus ábra Lei et al után módosítva [37] (Leírás a szövegben)

A Notch receptorok által szabályozott gének listája nem teljes, a legismertebb gének a bázikus helix-loop-helix (bHLH) hairy/enhancer od split (Hes) géncsalád tagjai, valamint a sejtciklust reguláló p21, ciklin-D1, myc, PTEN, EphrinB2; a Notch receptorral kapcsolatosak közül pedig ismert a Nrarp (Notch-regulated ankirin-repeat protein), a Deltex-1, és a pre-T cell receptor- α gén, illetve a simaizom aktin (SMA)[44].

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 családjába tartoznak. Az extracelluláris domén egy DSL nevű N-terminális szakaszból, valamint - a Notch receptorokhoz hasonlóan - EGF-szerű ismétlődő elemekből áll. A Jagged-1 és -2 ezen felül egy ciszteinben gazdag szakaszt is tartalmaz [39]. Egyelőre nem ismert, hogy a ligand és a receptor extracelluláris doménje közötti interakció pontosan milyen mechanizmuson keresztül okozza a receptor aktivációját. Valószínűleg az is meghatározó tényező, hogy a receptor a sejtnak pontosan melyik részén helyezkedik el. Jelenlegi ismereteink szerint a receptor és a ligand különböző sejteken található, azaz transz-aktiváció történik. A cisz-aktiváció jelenléte - amikor a ligand és a receptor ugyanazon sejt felszínén

található- sem zárható ki. Arra a kérdésre, hogy „Mi dönti el, hogy melyik sejt adja az aktív ligandot és melyik a receptort?” egyelőre még nincs válasz [45].

2.2.2 A Notch receptor működésének szabályozása

A Notch szignalizációs útvonal főleg poszttranszlációs úton szabályozódik, a receptor és a ligand extracelluláris doménjének glikozilációján (*Fringe* glikozil transferáz), vagy proteolízisén keresztül (*TACE/Adam17*, γ -szekretázok: pl. *preszenilin*). Számos más fehérje is hatással van a Notch útvonalra. Ilyenek például *Deltex* (RING domén E3 ubikvitin ligáz), amely ha nagy mennyiségben expresszálódik, elősegíti a Notch receptorok aktivációját; valamint a foszfo-tirozinkötő domént (PTB) tartalmazó *Numb* és *Numb-like*, amelyek a Notch fehérje endocitózisát és sejten belüli szállítódását szabályozzák. [45] Ez utóbbiak kontextustól függően pozitív vagy negatív Notch regulátorként is funkcionálhatnak [45]. A ligand oldaláról az elérhető ligandok mennyisége szabályozhatja a Notch útvonal működését. Ezeken kívül a *Mind bomb* ubikvitin ligáz, illetve a *Neuralized* molekula képes a Notch rendszert regulálni a ligand internalizációjának fokozása révén [46, 47]. Egyes feltevések szerint a receptor-ligand kötődéssel egyidőben történő ligand-endocitózis egy „húzóerőt” fejt ki a Notch receptorra, és ez okozza a második aktivációs lépést lehetővé tevő konformáció változást a Notch receptor extracelluláris doménjében [48].

2.2.3 A Notch aktivációval összefüggésbe hozott intracelluláris jelátviteli rendszerek

Jóllehet azt tudjuk, hogy a sejtmagban a Hes/Her géncsaládot szabályozza a NIC, az még mindig nem egyértelmű, hogy ezt milyen konkrét lépéseken keresztül teszi. Az irodalom eddigi (többnyire *drosophila melanogaster* kísérletekből nyert) adatai azt mutatják, hogy a Notch rendszer működése sokrétű, kapcsolódhat a foszfatidil-inozitol-3-foszfát kináz (PI3 kináz) kaszkád rendszerhez, a differenciálódásban kulcsfontosságú szerepet játszó wingless szignalizációs rendszerhez (WNT) [49], a stressre, inflammációra adott választ mediáló nukleáris faktor-kappa-B (NF κ B) szabályozó mechanizmushoz, avagy a citokinokat és növekedési faktorokat reguláló JAK/STAT kináz rendszerhez. Továbbá ismeretes, hogy a Notch-1 a kis GTP-

ázokon (R-ras) keresztül, - a sejteket az extracelluláris matrix-szal összekötő-integrinek ($\beta 1$) működését is képes regulálni [50, 51]. A fent említett mechanizmusokon keresztül a Notch receptorok képesek kulcsfontosságú sejt-funkciók, mint pl. a sejtprolifерáció, differenciálódás, apoptózis, illetve akár komplex folyamatok, mint pl. az immunválasz befolyásolására is.

2.2.4 A Notch receptorok fiziológias funkciója

A meghatározott alakú és méretű, több sejtől álló organizmusok egyetlen sejtől való kifejlődése a génállomány szigorúan koordinált aktivációjának az eredménye. Ezek a szabályozó folyamatok határozzák meg, hogy az egyes multipotens ő- és progenitor sejtekből az egyedfejlődés során milyen típusú sejtek keletkeznek. A Notch jelátvivő útvonal egyike a legrégebbi és legfontosabb szabályozó mechanizmusoknak, amelyek a többsejtes eukarióta élőlények *egyedfejlődését*, és a már kifejlett egyedek *szöveti homeosztázisának fenntartását* koordinálják. Kiterjedt irodalom foglalkozik a Notch receptorok fejlődésben játszott szerepével. A Notch receptorok a következő embrionális fejlődési szakaszok szabályozásában vesznek részt: a központi idegrendszer fejlődése, a szomiták kialakulása, a kardiovaszkuláris, az endokrin, az emésztőrendszer, illetve a csontrendszer fejlődése. Láthatjuk, hogy a Notch receptorok mind a három csíralemezből (endo-, mezo-, ektoderma) kiinduló szövettípusokat érintik.

2.2.5 Notch receptorok szerepe pathológiás folyamatokban

2.2.5.1 Öröklött betegségek

A Notch-1 receptor homozigóta deléciója egerekben letális kimenetű, az egérembriók nem élnek túl a 10,5 gesztációs napot. Ez is azt támasztja alá, hogy a Notch-1 receptor fontos jelentőségű az egyedfejlődés folyamatában. Emberek esetében eddig egy olyan, autoszomális dominánsan öröklődő, a bikuszpidaális aortabillentyű kalcifikációjával járó betegséget írtak le [52], ami közvetlenül a Notch-1 receptor mutációjával hozható összefüggésbe.

A Notch-2 receptor célzott deléciója egerekben az embriók perinatális elhalásához vezet, aminek a vese glomerulusainak elégtelen kifejlődése az oka. A

Notch-2 receptor mutációjához köthető még a gyermekekben előforduló Alagille szindróma, amely autoszómális dominánsan öröklődik, és a ductus choledochus fejlődési elégtelenségével (biliáris hipoplazia) jár, továbbá a szívet, a harántcsíkolt izomzatot, a csontrendszert és szemet jelentősen, és a vesét kismértékben érinti [53, 54].

A Notch-3 receptor homozigóta deléciójával bíró egerek világra jönnek, azonban a születést követően az artériák további kialakulásában, az azokat borító simaizomzat érési zavara miatt problémák lépnek fel, ami cerebrális vérkeringési zavarokhoz vezet. A Notch-3 receptor örökletes zavarát írták le a humán CADASIL szindrómában, ahol a Notch-3 receptor extracelluláris doménjének nagymértékű akkumulációja következik be a vaszkuláris simaizomsejtekben. Mindez stroke-hoz, subcortikális ischémiahoz, demenciához vezet, ami pathológiailag többszörös, mély cerebrális infarktusként, leukoencephalopathia-ként, valamint a kis méretű cerebrális artériák non-atherosclerotikus, non-amyloid angiopathiájaként írható le [55].

A homozigóta Notch-4 deléciójú egerek egészségesek, és szaporodásra képesek, azonban, ha mindez egyidejűleg Notch-1 delécióval kombinálódik, súlyos ér- és szívfejlődési zavar következik be. Az embereket érintő betegségek közül felmerült a Notch-4 gén és a humán schizofrénia kapcsolata, de ezt eddig nem tudták egyértelműen bizonyítani [56].

2.2.5.2 Rosszindulatú megbetegedések

Ellisen írta le legelőször (1991-ben), hogy a Notch receptorok felelősek lehetnek rosszindulatú megbetegedések – ezen belül *hematológiai eredetű malignómák*- kialakulásáért [57]. T-sejtes akut limfoblasztos leukémiából (T-ALL) származó limfocitákat megvizsgálva azokban egy, a Notch-1 gént és a T sejt receptor β -t (TCR- β) érintő transzlokációt [t (7;9)] fedeztek fel. Mint kiderült, ez kromoszómarendellenesség a Notch-1 receptor konstitutív aktiválódását eredményezte, ami daganatképződést idézett elő. A T-ALL, amely a Notch-okozta tumorok „prototípus”-ának is nevezhető, az összes leukémiák kb.15-20%-át adja. ALL-ban Notch-2 és Notch-3 receptor génjét érintő genetikai elváltozást eddig nem

találtak. A Notch-1 receptor aetiológiai szerepe a B-sejtes malignomákban is felmerült, pl. Hodgkin limfómában, ahol jelentős Notch-1 overexpresszió volt kimutatható a B-sejtek felszínén.

Később kimutatták, hogy a Notch receptorok számos *szolid tumor* kialakulásában is részt vesznek. Az elmúlt évtizedben felfedezték, hogy a Notch jelátvivőrendszer kóros működése onkogén-szerűen viselkedik az emlőrák, vastagbélrák, a korai stádiumú méhnyakrák, a hasnyálmirigyrák, valamint egyes agydaganatok kialakulásában[58-62]. Nagy meglepetésre néhány daganattípusban, mint pl a keratinocita eredetű daganatok (bazalioma, spinalioma), egyes B-sejt eredetű daganatok (B-ALL) [63], késői stádiumú méhnyakrák, hepatocellularis carcinoma [64] és a pajzsmirigyrák[65] esetében a Notch receptorok tumorszupresszorként viselkednek[66]. Nicolas és munkatársai azt találták, hogy ha a Notch-1 receptor működését specifikusan, az egér keratinocitákban inaktíválják (kondicionális ablációval), az epidermis hiperproliferációba kezd, ami daganat kialakulásához vezet [67]. Ezek az állatok kifejezetten érzékenyek voltak kémiai karcinogén hatásokra. Az egészséges bőrben a Notch-1 receptor feladata a keratinociták differenciálódásának elősegítése, és a sejtproliferáció gátlása.

Általános szabály, hogy az onkoproteineknek kollaborálniuk kell más onkoproteinokkal ahhoz, hogy rák kialakulását okozzák. T-ALL állatmodelljében azt találták, hogy a Notch-1 receptor génjének overexpressziója esetében a leukémia hosszú látenciaperiódusa jelentősen lerövidül, ha az állatokat onkogén hatású, egér leukémia virussal (MLV) is megfertőzik. Továbbá az is ismeretes, hogy a Notch fehérjék számos más, vírus eredetű onkoproteinnel, mint pl: simian vírus 40 (SV40), adenovírus E1A, humán papillomavírus (HPV) E6/E7 kollaborálhat a tumorgenezis többlépcsős folyamata során [68]. Wijzen és csoportja kimutatta, hogy a Ras onkogén fokozza a Notch-1 aktivációját, illetve, hogy a Ras által előidézett malignus transzformáció fenntartásához szükséges a Notch-1 receptor aktív működése [69]. A Notch-1 gén celluláris *proto-onkogénnel* együttműködve képes felgyorsítani a tumorképződés folyamatát különböző szövetekben. A Notch proteinek jellemző, leggyakrabban előforduló kóros mintázat az extracelluláris és a transzmembrán doméntól megfosztott, trunkált receptor konstitutív expressziója, amely membrántól független lokalizációjú.

A Notch-receptorok kettős szereppel bírnak, de hogyan lehetnek egyszerre *tumorsupresszorok és onkogének*? A jelenlegi magyarázat szerint a Notch receptorok működésének jellege nagyban függ a receptor típusától, a jel erősségétől, az időzítéstől, a sejtípustól és a szövettípustól [70]. Mivel a legtöbb daganat többféle Notch-receptort és Notch-ligandot is expresszál, azok kombinációja is megszabhatja, hogy onkogénként a vagy tumorsupresszorként vesz-e részt a Notch-1 receptor az onkogenezisben. A tüdő sejtjeiben, és az endothel sejtekben a Notch-1 gátolja a sejtproliferációt, míg a T-limfocitákban, és emlőrákban fokozza azt. A Notch receptor aktivációja a szöveti mikrokörnyezet hatása által, valamint bizonyos citokinek és növekedési faktorok által is szabályozódik: M-CSF (makrofág kolónia stimuláló faktor) jelenlétében a Notch receptor aktivációja a monociták apoptózisát okozza, míg GM-CSF (granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor) jelenlétében nem [71]. Prostatatumor egérmodelljében kimutatták, hogy a Notch-receptorok tumor-strómára kifejtett anti-apoptikus hatása a tesztoszterin szintjétől is függ [72]. Tüdő adenocarcinoma sejtekben a Notch-1 receptor hatása nagy mértékben függ az oxigénkoncentrációtól, ugyanis hypoxia fokozza a Notch-1 receptor aktivációját [73].

2.3 β -katenin

Nicolas és mtsai 2003-ban a Nature Genetics-ben leközölt cikkükben hívták fel a figyelmet a Notch-1 receptor és a β -katenin fehérjék kapcsolatára [67]. Kísérletekkel bizonyították, hogy a Notch-1 receptor tumorsupresszor szerepet játszik az egér epidermis-ből és cornea epitheliumból kiinduló daganatok kialakulásában, valamint azt is, hogy ez a Notch-1 okozta hatás összefüggésben áll a β -katenin fehérjék termelődésének szintjével. A Notch-1 és a β -katenin fehérje esetleges kapcsolatára a melanocita eredetű tumorokban mi is kíváncsiak voltunk.

2.3.1 Szerkezete, funkciója

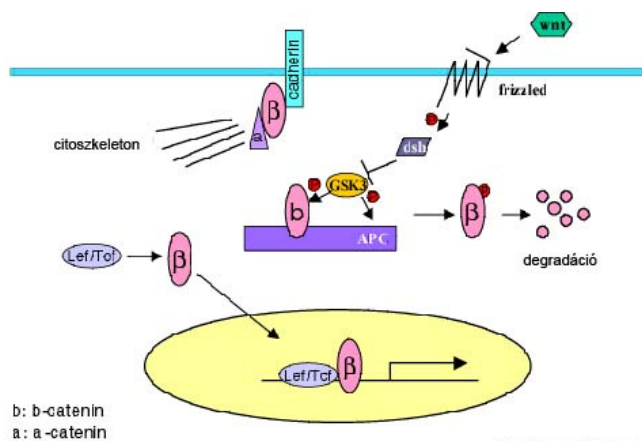
A β -katenin egy 92-97kDa méretű fehérje, amely az, α -, γ - és δ -katenin molekulákkal együtt (plakoglobinok) az E-kadherin receptor intracelluláris régiójához kötődik, és a zonula adherens része. A β -katenin molekulák feladatának a kadherineknak a citoszkeletonhoz való kihorgonyzását tartották [74], ezért kapták a katenin nevet (catena latinul láncot jelent). A zonula adherensek (intercelluláris

adherens junkciók) fontos résztvevői a sejtnövekedés szabályozásának. Az embrionális fejlődés, a sebgyógyulás, illetve a metasztázisképződés folyamata során új sejtek keletkeznek, amelyek elhagyják az epithéliumot. Ez utóbbi az epitheliális sejtek közötti kontaktus megszűnését, majd újraalakulását vonja maga után. Ezen folyamatok az adherens junkciókon keresztül szabályozhatók.

A sejtadhézió mellett a β -katenin fontos szerepet játszik az embrionális fejlődés szabályozásában is. A wingless (WNT) jelátviteli rendszernek tagja, ahol transzkripciósfaktorként a test részarányosságának, és szelvényezettségének szabályozásában vesz részt, amit drosophila kísérletekben bizonyítottak [75]. A WNT útvonal a három legfontosabb, az embrionális fejlődést szabályozó rendszerek (Wingless/WNT, Sonic-Hedgehog és Notch) egyike.

2.3.2 A β -katenin működésének szabályozása

A β -katenin a sejtben belül több, különböző kompartmentben is megtalálható. A membránhoz asszociált β -kateninek az adhézióban, míg a citoplazmában található β -kateninek a szignáltranszdukcióban vesznek részt. Amennyiben a WNT receptor nincs aktiválva, a citoplazmában található β -kateninek foszforilált állapotban vannak (a GSK3 β enzim által), ami ubiquitinálódáshoz, és a proteoszómákban történő degradációjukhoz vezet. Ha a WNT receptor (Frizzled) aktiválódik, úgy szabad, stabilizálódott (aktív) β -kateninek halmozódnak fel a citoplazmában, amelyek a sejtmagba bejutva a TCF/LEF szekvencia specifikus DNS-kötő fehérjéken keresztül transzkripciósfaktorként funkcionálnak (8.sz. ábra). Eddigi ismereteink alapján a következő gének sorolhatók a β -katenin által szabályozott gének közé: ciklin D1, c-Myc, c-Jun, Fra-1, mátrix metalloproteináz-7, fibronectin, ciklooxygenáz-2, m-Mitf, ephrinB2, EphB3 és EphB1[76].



8.Ábra: A β -katenin működése és szabályozása. Sematikus ábra. Novak & Dedhar után módosítva) [76] (Leírás a szövegben)

2.3.3 β -katenin jelentősége malignus megbetegedésekben

Eddigi ismereteink alapján a β -katenin molekula normálisnál nagyobb fokú működése elősegíti a tumorok kialakulását. A túlműködés oka többnyire a fehérje szerkezetét érintő mutáció. Ezek általában a GSK3- β foszforiláció helyét (szerin reziduumokat) érintik, és a β -katenin nukleáris felhalmozódásához vezetnek. [77] A melanomák esetében a β -katenin gén mutációja előfordul, de nagyon ritka (65 esetből 1) [78], viszont az esetek 1/3-ában a β -katenin fehérje nukleáris akkumulálódása ennek ellenére kimutatható. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a β -katenin tartós aktivációja más mechanizmus révén is bekövetkezhet.

A másik, túlműködéshez vezető ok a β -katenint reguláló génekben bekövetkező genetikai változás lehet. Ezek közül az *apc* tumorszupresszorban bekövetkező mutáció a legismertebb eltérés, amely klinikailag a familiáris adenomatosus poliposis szindrómához vezet [79].

3 Anyagok és módszerek

3.1 Reagensek, antitestek:

SDS-poliakrilamid gélt az Invitrogen-től (Carlsbad, CA USA), $^3\text{[H]}$ timidin-t (1mCi/ml) az Amersham Biosciences-től (Manassas, VA, USA), a DAPT-t a Calbiochem-től rendeltük (La Jolla, CA, USA). Az MTT sejt proliferációs-kit az ATCC-től (Manassas, VA, USA), az ssDNS apoptózis ELISA kit a Chemicon International-től (Billerica, MA), a Live-Dead kit a Molecular Probes-től (Carlsbad, CA USA) származott. Minden egyéb vegyszer és oldat a Sigma-Aldrich terméke (St. Louis, MO), hacsak másképpen nincs jelölve. Felhasznált antitestek: anti humán Notch-1 (ab8925, Abcam), Notch-1 (925), nyúlban termelt poliklonális immunsavó, β -katenin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA), Myc-Tag9B11 (New England Biolabs, Ipswich, MA USA), Mel-CAM (P1H12, Abcam, Cambridge, MA USA), E- és N-cadherin (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) FAK és pFAK (BD Biosciences, San Diego, CA) illetve β -aktin (Ac-15, Sigma).

3.2 Sejtenyésztés:

A felhasznált sejtvonalak listáját az 1-es táblázat tartalmazza. A humán melanoma sejtvonalakat (WM35, WM115, WM278, WM3248, WM239A and 1205Lu) különböző stádiumú melanoma szövetmintákból izoláltuk és tenyésztettük, (lásd megelőző tudományos közleményekben). Az Sbcl2, felszínesen terjedő stádiumnak megfelelő sejtvonalat B. Giovanelli-től (St. Joseph Hospital, Houston, TX USA) kaptuk. A FOM104, FOM105 és FOM117 humán melanocita sejtvonalakat emberi epidermisből izoláltuk és tenyésztettük egy korábban leírt módszer alapján [80]. A részletek a hivatkozásban megtalálhatók. A melanoma sejteket komplett tumor médiumban (MCDB153 és L-15 4:1 keveréke 2% borjúsavó, 5µg/mL inzulin, 1.6mmol/mL CaCl₂-mal kiegészítve) tenyésztettük. A HEK 293T sejteket (AMPHO) és a COS7 sejteket 10%-nyi fetális borjúsavót (FBS) tartalmazó DMEM tápfolyadékban (Invitrogen Corp.) növesztettük. A SUP-T1 sejteket 10% FBS-t és 2mM L-glutamin-t tartalmazó RPMI 1640-ben tenyésztettük.

1	FOM104	melanocita
2	FOM105	melanocita
3	FOM117	melanocita
4	Sbcl2	melanoma, radiális növekedési fázis, RGP
5	WM35	melanoma, radiális növekedési fázis, RGP
6	WM115	melanoma, vertikális növekedési fázis, VGP
7	WM278	melanoma, vertikális növekedési fázis, VGP
8	WM3248	melanoma, vertikális növekedési fázis, VGP
9	WM1205Lu	melanoma, metasztatikus (tüdőmetasztázisból), MET
10	WM239A	melanoma, metasztatikus (primer tumorból), MET

1. Táblázat: A kísérletekben felhasznált humán eredetű sejtvonalak listája

3.3 Sejtadhézió vizsgálata

A melanoma sejtek adhézióját a következők szerint vizsgáltuk: műanyag, 24-lyukú lemezbe 1×10^5 sejtet szélesztettünk lyukanként komplett tumor médiumban, majd 30 percig inkubáltuk 37°C fokon. A le nem tapadt sejtek eltávolítása céljából PBS-sel mosást végeztünk, majd a letapadt sejteket megszámoltuk, és fényképet készítettünk. A homotípusos sejtadhézió vizsgálata céljából 5000 sejtet tettünk 1.5%-os agarral (Difco, Sparks, MD USA) borított 96-lyukú lemezbe, majd 48 órán keresztül inkubáltuk komplett tumor médiumban. Az agar borítás révén a sejtek

mindvégig non adherens állapotban maradtak, mert az megakadályozta a melanoma sejteknek a műanyag felszínhez történő kitapadását.

3.4 Három-dimenziós szferoidok növekedésének vizsgálata agarban:

A melanoma szferoidok a „liquid overlay” módszerrel készültek. Röviden összefoglalva a lényege a következő: 200 μ L-nyi (25,000/mL) melanoma sejtet helyezünk 1.5%-os agarral borított 96-lukú lemezbe lyukanként. A lemezeket 48 órán át inkubáljuk, ami alatt a sejtek három dimenziós struktúrába rendeződnek az agaron. A szferoidokat ekkor begyűjtjük, majd I-es típusú borjú kollagén gélbe ágyazzuk be, amit DMEM-mel és L-glutaminnal hígítunk. A megszilárdult gél tetejére komplett tumor mediumot tettünk, majd a szferoidokat újabb 72-96 órán keresztül inkubáltuk. Ekkor PBS-sel 2x megmostuk, majd a LIVE/DEAD Viability kit-tel megfestettük, az előírásnak megfelelően. A már nem élő sejtek, amelyek a membránjuk integritását elvesztették, vörösre festődnek. A szferoidokat ezt követően NIKON 300 invert mikroszkópon át lefényképeztük. (Nikon, Melville, NY, USA) A módszer részletes leírása az idézett szakirodalomban megtalálható [81].

3.5 Western (immuno) blot és immunhisztokémia:

Western blot: A tenyésztett sejteket PBS-ben mostuk, lízis-pufferben (5mM EDTA, 2mM Tris-Cl, 20-mM leupeptin, pH 7.4) homogenizáltuk, majd 30 percig 4 °C-on (jégen) inkubáltuk. Ezt követően a sejt-lizátumokat SDS mintapufferben (10% glicerin, 2% SDS, 0.062 M Tris, 20mM ditiotritol, 0.002% brómfenolkék és 5% β -merkaptotanol; Sigma) 5 percig főztük, majd -70 °C-on tároltuk felhasználásig. A minták proteintartalmát BCA protein assay-vel határoztuk meg (Pierce, Rockford, IL, USA). Az így elkészített mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS page), 8%-os gélben választottuk el, majd a fehérjéket a gélről PVDF (Millipore, Billerica, MA usa) membránra vittük át (Bio-Rad, Hercules, CA USA). A membrán szabad kötőhelyeit 5%-os tejpor oldattal blokkoltuk, majd az elsődleges antitesttel 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációt követően a membránokat TBS-T-ben (0.1% Tween20, Sigma) mostuk, majd megfelelő, torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (Amersham Sciences, 1:5000 hígítás) inkubáltuk. Az immunjelek rögzítésére kemilumineszcens szubsztrátot használtunk (ECL Kit,

Pierce, Rockford, IL USA), majd a jelet fényérzékeny filmre (KODAK, Rochester, NY) rögzítettük.

Immunhisztokémia: A 15 naevus pigmentosus, és 15 melanoma malignum diagnózisú esetből származó szövettani metszetek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Bőrklinikájáról származtak. A 7µm vastag (paraffinba ágyazott mintákból származó) metszeteket deparaffinizáltuk, rehidráltuk, amit az endogén peroxidáz működésének blokkolása (1% H₂O₂ metanolban, 20 percig), majd az antigén feltárása követett (10 perces forralás 10 mM-os citrát pufferben). A szövetmintákat kecske-, illetve lószérummal blokkoltuk (2%, PBS-ben) majd patkány anti humán Notch-1 (bTAN20, developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA) vagy egér anti humán HMB-45 (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA USA) elsődleges antitesttel inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A minták PBS-sel való mosása után biotinnal konjugált másodlagos antitestet, majd a Vector laboratories (Burlingame, CA USA) ABC kit-jét alkalmaztuk. Az enzimaktivitást AEC (vörös) kromogénnel detektáltuk, végezetül a sejtmagokat hematoxylinnal megfestettük. A negatív kontrollok esetében az elsődleges antitestet non-immunogén immunglobulinnal helyettesítettük.

3.6 Real-time PCR és szemikvantitatív PCR:

Először teljes RNS-t izoláltunk Trizol-lal (Invitrogen Corp.). Majd cDNS-t szintetizáltunk 500ng RNS-ből a TaqMan Gold RT-PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) segítségével a Real-Time PCR-hoz a gyártó leírása szerint. A cDNS mintákat 20-szorosra hígítottuk, majd SYBR green Jumpstart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich)-t reagenst alkalmazva, 100µM primer koncentráció mellett real-time PCR reakciót végeztünk ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) gépen. Az amplifikáció paraméterei: 2 percig 50°C, 10 percig 95°C (a különböző enzimek aktivációja, illetve deaktivációja céljából), amit 40 cikluson keresztül 15 másodperc 95 °C-on (denaturáció) + 1perc 95°C-on (bázispárok kialakulása, elongáció) követett. Az eredményeket β-aktin primer révén standardizáltuk. Minden minta és standard minta eredménye háromszori mérés átlaga. Az eredmények meghatározásához standard görbét készítettünk a threshold cycle (Ct) értékek figyelembevételével, majd a mintákat a β-aktin szint révén normalizáltuk. Végezetül a génexpresszió szintjét a FOM104 sejtekben 1-nek vettük.

A primerek szekvenciáját Primer Express (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg. Ezek a következők voltak: HEY1: 5'-AGCCGAGATCCTGCAGATGA-3' és 5'-GCCGTATGCAGCATTTTC-AG-3'; HEY-2: 5'-AGATGCTTCAGGCAACAGGG-3' és 5'-CAAGAGCGTGTGC-GTCAAAG -3'; HES1: 5'-GTGCATGAACGAGGTGACCC-3' és 5'-GTATTAACG-CCCTCGCACGT-3'; HES2: 5'-AGA AACTCCA AACTGCTCGAAGCT -3' és 5'-CGGTCATTTCCAGGACGTCT-3'; Jagged1: 5'-GAGCTATTTGCCGACAAGGC-3'; valamint β -aktin: 5'-CCTCACCCTGAAGTACCCCA-3' és 5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'. A szemi kvantitatív PCR-t egy korábban közölt módszer [82] alapján végeztük. Ehhez a következő primer párokat használtuk fel: β -katenin: 5'-GTTCGTGCACATCAGGATAC-3' és 5'-CGATAGCTAGGATCATCC-TG-3' (a termék 429 bázispár hosszú); valamint β -aktin: 5'-TCTACAATGAGCT-GCGTGTG -3' és 5'-CAACTAAGTCATAGTCCGCC-3' (a produktum 878 bázispár hosszú).

3.7 Sejtnövekedés és apoptózis mérése:

A sejtnövekedést MTT módszerrel vagy pedig ^3H timidin beépülés mértékének meghatározásával mértük ([83, 84]). Az MTT módszert a gyártó által leírt lépések alapján végeztük. Apoptózist az „ssDNA apoptosis ELISA kit”-tel (Chemicon International) mértük, a gyártó leírása szerint.

3.8 Kolónianövekedés agarban (soft agar colony formation assay)

A módszer lényege a következő: vályúnként 3×10^3 melanoma sejtet helyeztünk FBS-t is tartalmazó 0.33%-os agar gélbe keverve 6-lukú lemezbe. A vályúk felszínét a sejtek behelyezése előtt 0.5%-os agarral befedtük a műanyag felszínnel való érintkezés elkerülésére. Minden mintából triplikátumot készítettünk, amelyekhez végezve melanoma (tumor) tápfolyadékot adtunk. A sejtkolóniákat 10 nap inkubálás után megszámoltuk, majd a mintákat lefényképeztük.

3.9 Rekombináns adeno-, retro- és lentivirális vektorok létrehozása

Génbevitel céljából különböző virális vektorokat hoztuk létre [85]. A zöld fluorescens fehérje (GFP)- lentivírus plazmid (pHX^{CMV}-GFP) a University of Pennsylvania (UPENN, Philadelphia, PA, USA) Orvostudományi Karának orvosi genetikai tanszékéről származott [86]. A N^{lC}-GFP/lenti vírus (p'HX-CMV-N^{lC}-IRES-

GFP) készítésekor a N^lC gén szakaszt [82] a pIRES2-EGFP (BD-Biosciences-Clontech) plazmidba az EcoRI and BamHI hasítóhelyek közé illesztettük be. Ezután a N^lC-IRES-GFP génszakaszt XhoI és DraI-nal enzimatikusan kihalásítottuk. A pHX'CMV-GFP vektorban a GFP gén helyére a N^lC-IRES-GFP génszakaszt helyeztük be. Hogy ezt megoldhassuk a pHX'CMV-GFP vektort NotI és BamHI enzimekkel hasítottuk. A rövid, GFP-t tartalmazó gén eltávolítása után a megmaradó 2 génfragmentumot ligáltuk, ahol egy rövid összekötőszakaszt is elhelyeztünk (5'-GGCCGCCCCGGG -3' 5'-GATCCCCGGGC -3'-vel összeillesztve) egy SmaI hasítóhely létrehozása céljából a NotI és a BamHI hasítóhelyek között. A N^lC-IRES-GFP génfragmentet beleillesztettük a módosított pHX'-CMV vektorvázba az SmaI hasítóhelyen keresztül. Az H1UG egy FG12-es lentivírus vektorból származtatható virális vektor, amelybe egy humán H1-es promotor (HuH1) van beillesztve a Flap element és a UbiC promotor közé (XbaI-EcoRI-HuH1-BamHI-HindIII-ClaI-Sall-XhoI hasítóhelyekkel rendelkezik) [87]. Minden egyes létrehozott plazmid esetében a helyes szerkezetről restriktációs enzimhasítással, illetve DNS-szekvenálással bizonyosodtunk meg.

A pseudotípusos lentivírusokat a következőképpen növesztettük fel: 293T sejteket az előírt [86] 3 plazmiddal: a fehérjeburok létrehozására való képtelenséget biztosító (packaging-deficient) pCMVΔR8.2 plazmiddal, a pMD.G (UPENN, Orvosi Genetikai tanszék, Générációs program, Philadelphia, PA, USA) segédgénszakasszal (ami vesicularis stomatitis vírus glikoprotein burkot, VSV-G kódol), valamint a transzgént tartalmazó plazmiddal egyidejűleg megfertőztük. 48 órával a calcium-foszfátos módszerrel történő transziens megfertőzés után a sejtek vírust tartalmazó felülszóját összegyűjtöttük, 0.45μm-es filteren átszűrtük, majd felhasználásig kis egységekben -70°C-on tároltuk. A vírus titerét NIH/3T3 sejtek transzdukciójának mértéke segítségével határoztuk meg. A zölden fluoreszkáló, sikeresen megfertőzött sejteket mikroszkóp alatt megszámoltuk. A fertőzés után 48 órával begyűjtött lentivírus szuszpenzió titerét NIH/3T3 sejtekben ~10⁸ transzdukciós egység/ml-ben határoztuk meg.

A MAML1/pBabe, DN MAML1/pBabe és az üres pBabe (mock) retrovírus vektor szerkezetét lásd korábbi publikációkban[88]. A rekombináns retrovírusok létrehozása során a vektort Phoenix (AMPHO) retrovírus-szaporító sejtekbe (G.P.

Nalon, Stanford Egyetem, Kalifornia, USA) jutattuk be szintén a kalcium-foszfát módszer segítségével.

Általánosságban elmondható, hogy az alkalmazott recombináns adenovírusok titere kb. 10^8 transzdukciós egység/ml volt.

Interferáló kis RNS lentivirális vektor létrehozása: a részletek az eredmények fejezetben találhatók.

3.10 A célsejtek vírusvektorral való megfertőzése

A célsejtek megfertőzése során a lenti-, illetve a retrovirális vektort 16 órán keresztül inkubáltuk a target sejtekkel a sejtenyészítő tápfolyadékkal 1:2-1:10 arányban hígítva (a célsejt típusától függően) 4 µg/mL polibrén (Sigma-Aldrich) jelenlétében. Adenovírussal való megfertőzés esetében a célsejteket szérummentes tápfolyadékban inkubáltuk a vírusrészecskékkel 4 órán keresztül. Ezt követően a sejteket PBS-sel megmostuk, és normál tápfolyadékukban további 2 napig tenyésztettük, majd kísérletre (fehérjetermelődés kimutatása immunoblottal vagy más módszer céljára) felhasználtuk.

3.11 Állatkísérletek

A felhasznált CB-17 SCID egerek egyik része a Charles River Laboratories-tól származott, a másik részét a DEOEC Bőrklinika 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 1x mértük, majd a hetedik héten későbbi analízis céljából eltávolítottuk, súlyát megmértük, majd OCT-ben -70°C-on tároltuk. A tüdő-kolonizációs kísérlet céljából 2×10^5 sejtet injektáltunk intravénásan az egerekbe (100 µL PBS-ben szuszpendálva) a farokvénán keresztül (n=12). A hetedik hét végén az egereket elaltattuk, a tüdőt eltávolítottuk, majd Leica MZ125 disszekciós mikroszkóp alatt a tüdőben létrejött tumorkolonékat megszámoztuk, és 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 korábban leírt módszer szerint megvizsgáltuk.

3.12 Luciferáz vizsgálat

A sejteket 24-lyukú lemezben 1 µg/lyuk TOPflash vagy TOPflash-Reporter plazmiddal (Promega, USA) Lipofectamin 2000 (Invitrogen Corp.) módszerrel tranziensen megfertőztük, majd azokat 24 órán keresztül 2 mL szérumszentes tápfolyadékban inkubáltuk 37°C-on. Ezt követően a sejteket lizáltuk, és a luciferáz aktivitást a reagens előállítójának előírása alapján (Enhanced Luciferase Assay Kit, BD-Biosciences-Pharmingen) luminométerrel megmértük (Thermo Fluoroskan Ascent FL). A háttér eredményt a TOPflash értékéből meghatároztuk, és az eredményeket ez alapján korrigáltuk. A kapott eredményt - a GFP-vel fertőzött sejtek értékét 100-nak véve - normalizáltuk.

3.13 Statisztikai módszerek

A szám adatok átlagértékek $\pm$ standard deviáció (SD). Az eredmények szignifikáns voltát Student-féle T-próbával állapítottuk meg. A p értéket 0,05 alatt tartottuk szignifikánsnak.

4 Eredmények

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

Első lépésként a Notch-1 fehérje jelenlétét hasonlítottuk össze 15 naevus pigmentosus-os és 15 melanoma malignummal diagnosztizált beteg szövettani mintáján. A szövettani metszeteket a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájának Patológiai részlegéről kaptunk.

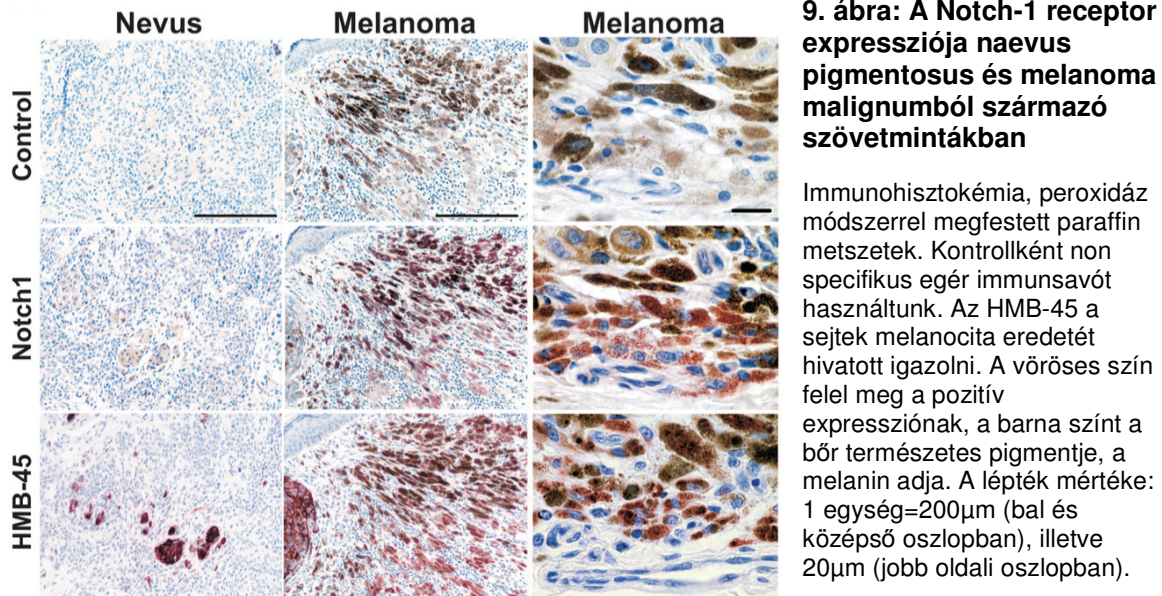
A naevus pigmentosusos betegek átlagéletkora 28.26 év (n=15), SD=17.33; a melanoma malignumos betegek átlagéletkora pedig 55.53 év (n=15), SD=15.12 volt. A nemek egyenlő eloszlására ügyeltünk. A melanoma malignumos esetek részletes adatait (életkor, diagnózis és stádium) a 2-es táblázat tartalmazza.

	Diagnózis	Clark	Breslow (mm)	Életkor
1	Melanoma malignum	I	0.1	30
2	Melanoma malignum (SSM)	II	0.4	51
3	Melanoma malignum (SSM)	II	0.7	81
4	Melanoma malignum (SSM)	II	0.22	78
5	Melanoma malignum (SSM)	III	0.55	70
6	Melanoma malignum (SSM)	III	0.95	54
7	Melanoma malignum (SSM)	III	0.85	52
8	Melanoma malignum (nod)	III	2.35	31
9	Lentigo maligna melanoma (LMM)	III	0.56	69
10	Melanoma malignum (SSM)	III	0.68	48
11	Melanoma malignum	III	1.70	54
12	Melanoma malignum	IV	2.98	54
13	Melanoma malignum (nod)	V	5.50	51
14	Melanoma malignum (nod)	V	6.0	43
15	Melanoma malignum (exulc)	V	12.50	67

2. Táblázat: az immunohisztokémiára felhasznált melanomás esetek részletes adatai

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszetek szövettani festése során azt találtuk, hogy a Notch-1 receptor a 15 melanomás mintából 10 esetben, míg a

naevus pigmentosus esetében 15 mintából csak 1-ben volt detektálható (9. ábra). A Notch-1 receptor a sejtplazmában és a sejtmagban is megfigyelhető. Ez utóbbi arra utal, hogy a receptor érése során keletkező aktív receptor (N^{IC}) transzlokálódott a nukleuszba, azaz a Notch-1 receptor minden valószínűség szerint funkcionálisan aktív.



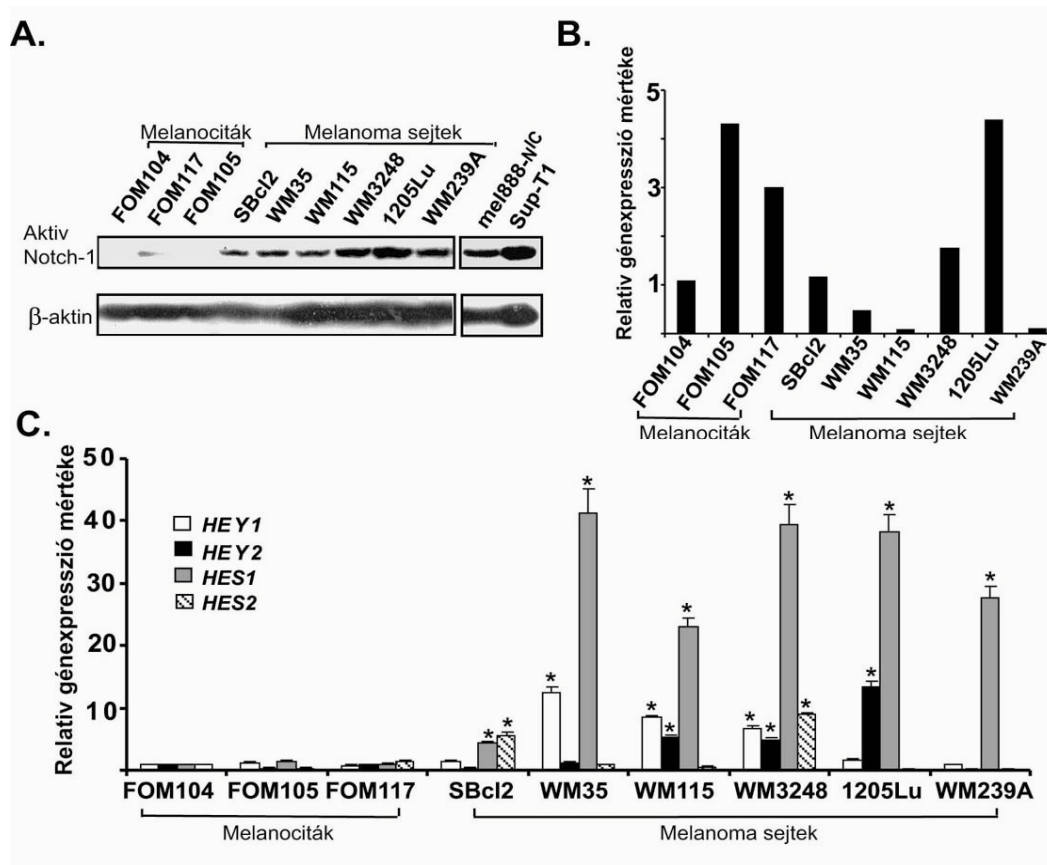
4.2 Notch-1 receptor és a „target” gének expressziója különböző növekedési fázisból származó humán melanoma sejtvonalakon és melanocitákon

Notch receptorok funkcionális állapotának vizsgálata céljából először megvizsgáltuk, hogy a receptor aktivált állapotban van-e jelen a különböző melanoma sejtvonalakban. A hat, különböző növekedési fázisból származó melanoma sejtvonalból és három primer melanocita sejtvonalból származó mintákon immunoblot analízist végeztünk egy kizárólag az aktív receptort felismerő immunsavót alkalmazva. (10.A ábra) Eredményül azt kaptuk, hogy a receptor aktív alakja mind a hat melanoma sejtvonalban jelen volt, míg a melanociták közül csak 1-ben, és az is csak kis mértékben. Pozitív (ismerten Notch-1-t expresszáló) kontrollként SUP-T1 sejteket –humán T-sejtes leukémia sejtvonal t(7;9)(q34;q34.4

transzlokációval-, 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 (10.B ábra).

Ezen túlmenően a Notch receptorok által leggyakrabban szabályozott target gének, a HEY1, HEY2, HES1, HES2 mRNS expressziójának mértékét is megmértük kvantitatív real-time PCR-ral (10.C ábra). Azt találtuk, hogy melanoma sejtekben a feltételezett target gének közül legalább egy (legerősebben a HES-1) gén aktiválódva volt, viszont a 3 melanocita sejtvonal esetében egyetlen egy sem. Adatainkat összegezve elmondhatjuk, hogy a Notch jelátvivő útvonal elemei a melanoma sejtekben aktívan működnek.



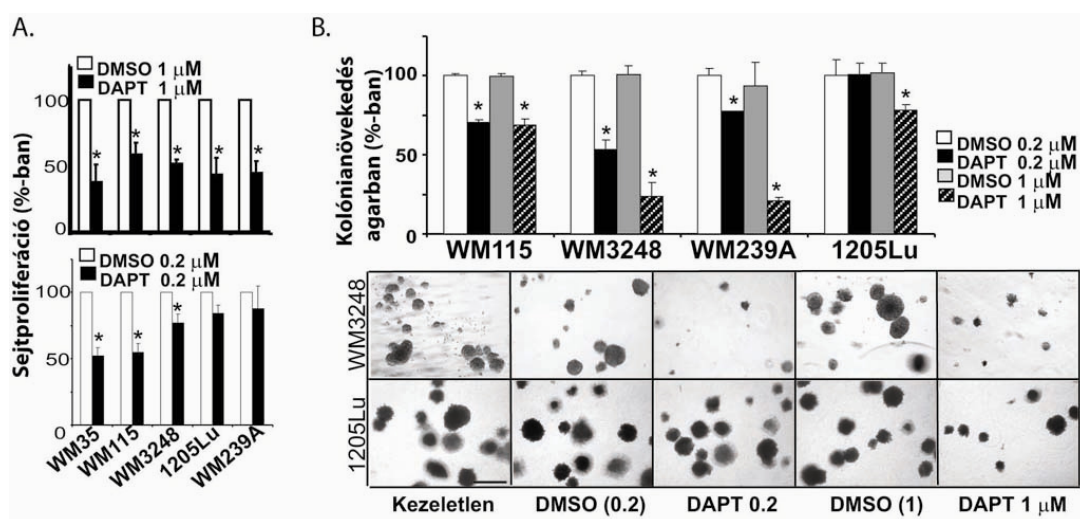
10. ábra: A Notch útvonal komponenseinek expressziója melanoma és melanocita sejtekben: A) Notch-1 fehérje expressziója, western blot, B) Jagged-1 mRNA szintje, kvantitatív real-time PCR. C) HEY1, HEY2, HES1, HES2 mRNA expressziója, kvantitatív real-time PCR.

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

4.3.1 A receptor aktivációjának visszaszorítása farmakológiai inhibitorral a γ -szekretáz enzim gátlásával

A következő kísérlet során azt szeretnénk tudni, hogy a Notch útvonalnak a gátlása hatással van-e a melanoma sejtek növekedésére? A Notch-receptor működésének (érésének) gátlására egy γ -szekretáz inhibitor, a N-[N-(3, 5-difluorofenacetil-L-alanil)]-S-fenilglicin t-butil észter-t (DAPT) alkalmaztuk alacsony (0.2 μ M) és nagy (1 μ M) dózisban.

Minden melanoma sejtvonal a proliferáció csökkenésével reagált a nagyobb dózisa, viszont a kis dózis csak a korai stádiumú sejtekre (WM35, WM115 és WM3248) volt hatással, a metasztatikus sejtvonalak növekedésére nem. (11.A ábra) Hasonló eredményt kaptunk a kolónianövekedési kísérlet (soft agar assay) alkalmazásával: a DAPT a kisebb dózisban csak a korai stádiumú sejtekre (WM3248) volt gátló hatással, a metasztatikus melanoma sejtekre (1205Lu) nem. (11.B és C ábra) Ezen eredmények alapján egyértelműnek tűnik, hogy a különböző stádiumú sejtvonalak eltérő érzékenységgel rendelkeznek a DAPT-vel szemben.



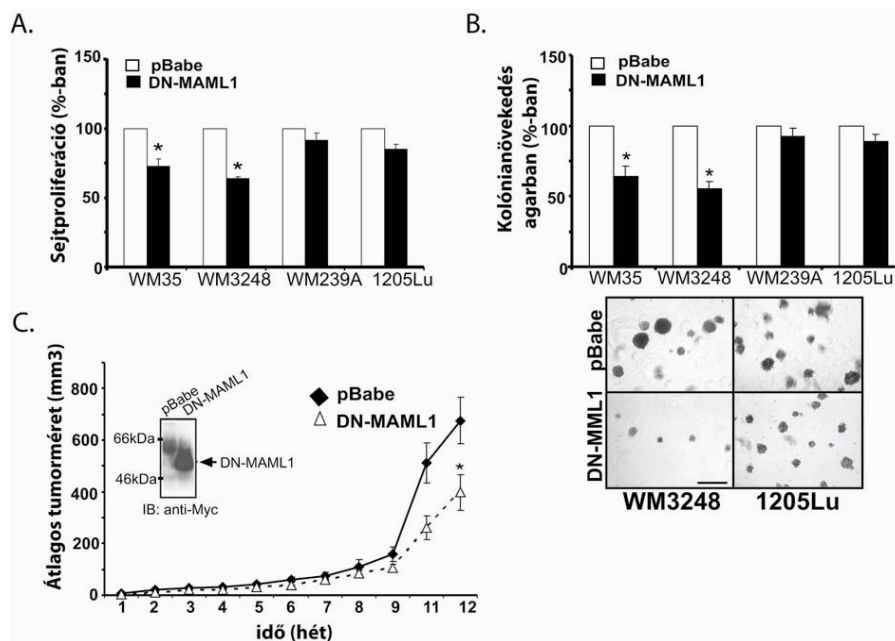
11. ábra: A Notch receptorfehérje gátlásának hatása a sejtnövekedésre.

A γ -szekretáz enzim gátlása DAPT-vel, (DMSO a kontroll). A) Sejtproliferáció, MTT-teszt. B) „anchorage independent” növekedés vizsgálata, kolónianövekedés agarban.

4.3.2 A receptor indukálta transzkripció gátlása MAML-1 transzkripció 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 domináns negatív (funkcionálisan inaktív, trunkált, DN) formáját overexpresszáltuk a WM35, WM3248, WM239a és 1205Lu melanoma sejtekben egy retrovirális vektor (pBabe) segítségével. A DN-MAML1 fehérje expressziójáról immunoblottal bizonyosodtunk meg WM3248 sejteken (12.C ábra).

Ahogy a 12. ábra is mutatja, a DN-MAML1 fehérje gátolta a sejtnövekedést és a kolónianövekedést a korai stádiumú melanoma sejtekben, viszont a metasztatikus melanoma sejtekben nem. A sejtprolifерációt 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazólium bromid (MTT) módszerrel mértük. Amennyiben a DN-MAML1-transzfektált melanoma sejteket SCID egerekbe oltottuk, azok lassabban eredményeztek daganatot (12.C ábra). Ezen eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Notch rendszer működésének szintje, mértéke, valamint befolyásolhatósága a melanoma növekedési fázisától (RGP, VGP, metasztatikus) függhet. Összefoglalva, adataink azt sugallják, hogy a Notch jelátvivő rendszer fontos szerepet játszik a primer, korai stádiumú melanoma sejtek növekedésének stimulálásában, és ezen szerepe miatt akár tumorellenes gyógyszerek kifejlesztéséhez is kiváló célpontot adhat.



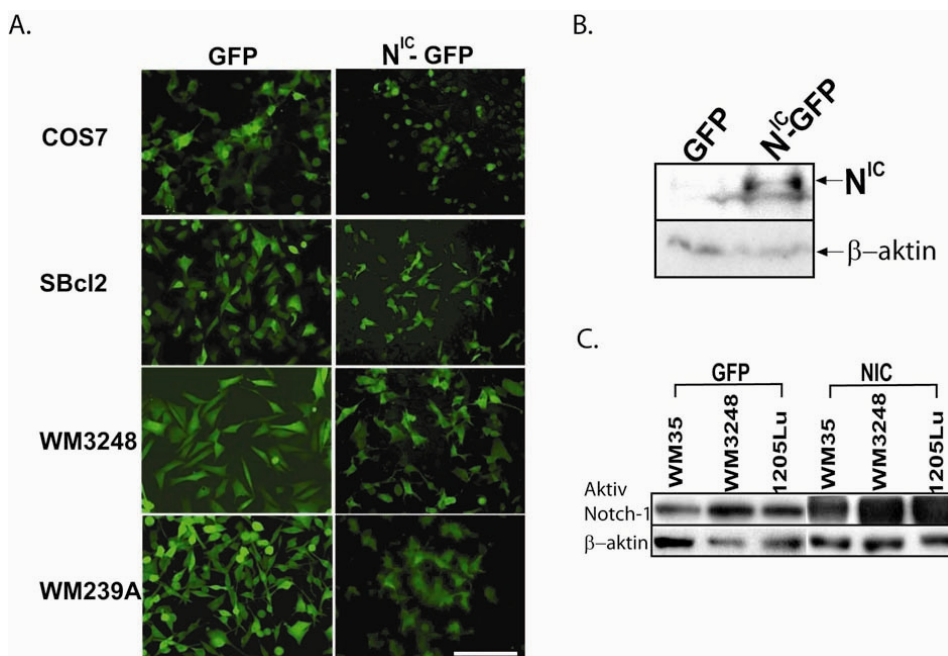
12. ábra: A Notch szignálkaskád transzkripciós szintű gátlásának hatása a sejt és tumornövekedésre. A) MTT sejtproliferációs teszt, B) kolónianövekedés agarban, C) szubkután tumor növekedése SCID egérben.

4.4 Notch receptor konstitutív aktivációja humán melanoma sejtekben

4.4.1 Permanens Notch-1 receptor aktiváció előidézése a célsejteken

Hogy a Notch jelátviteli rendszer sejtnövekedésre kifejtett, normálistól eltérő működését vizsgálni tudjuk, nagy mennyiségű aktív Notch-1 receptort juttattunk be különböző melanoma sejtvonalakba. Első lépésként COS7 sejteket fertőztünk meg N^{IC}-GFP lentivírral, majd 48 óra inkubáció után Western-blottal ellenőriztük a NIC fehérje jelenlétét a sejtekben (13.B Ábra). A GFP-lentivírral fertőzött kontroll mintában (COS7 sejtekben) nem találtunk N^{IC} expressziót. Ezt követően hasonlóképpen megfertőztük a melanoma sejteket is, majd invert fluoreszcens mikroszkop alatt - a zöld fluoreszcenciát alapul véve - meggyőződünk a transzgének sikeres beviteléről. A melanoma sejtek 95%-ában találtunk egyértelmű zöld fluoreszcens jelet. Az aktív Notch receptor jelenlétét a különböző sejtvonalakban a 13. A számú ábra mutatja. A további kísérleteink során ezeket a permanensen módosított melanoma sejtvonalakat használtuk, kontrollként pedig a csak gfp-vel módosított verziójukat alkalmaztuk. Végezetül immunoblottot végeztünk minden

melanoma sejtvonalon, hogy ilyen módon is ellenőrizzük a N^{IC} fehérje jelenlétét a sejtekben, az eredményt a 13.C ábrán láthatjuk.



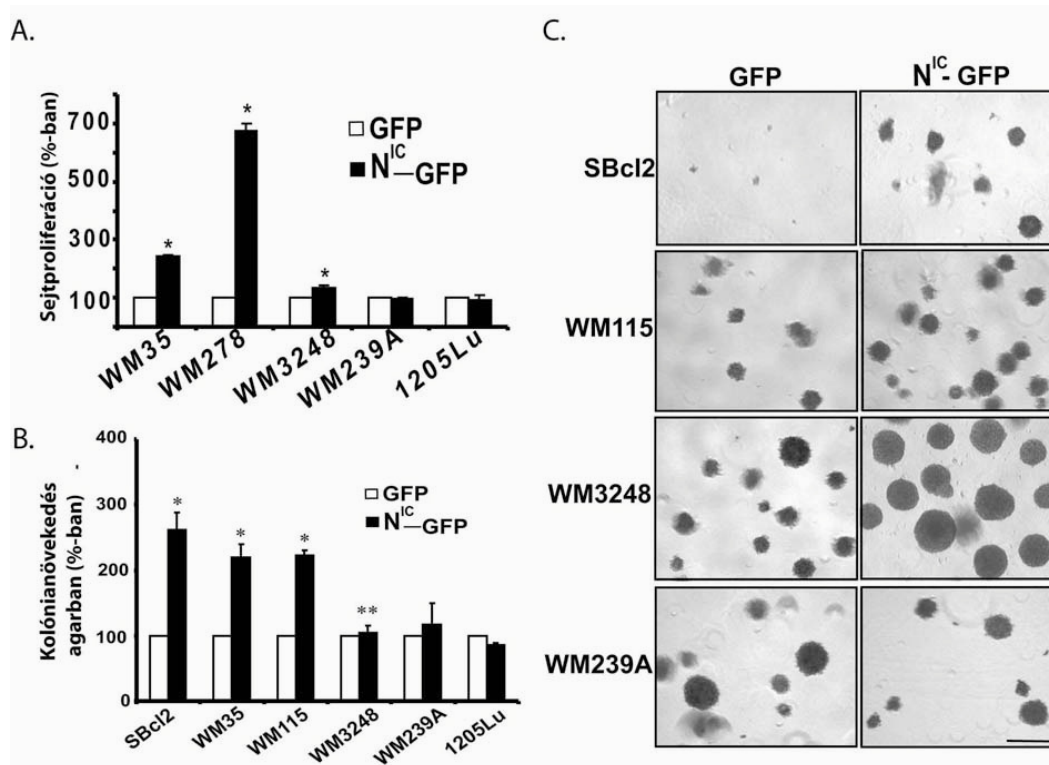
13.ábra: Notch-1 aktív alakjának konstitutív expressziója melanoma sejtekben. A) Fluoreszcens mikroszkópos felvétel a GFP, green fluorescent protein detektálására (egység=20μm), B) Immunoblott analízis transzfektált Cos7 sejteken és C) transzfektált melanoma sejteken a NIC fehérje kimutatása céljából.

4.4.2 Az állandó génaaktiváció in vitro hatása

4.4.2.1 Sejtnövekedés vizsgálata és kolónianövekedés agarban

A ³[H]timidin inkorporáción alapuló sejtproliferáció-vizsgálat során azt találtuk, hogy a N^{IC}-GFP-vel megfertőzött, korai stádiumú melanoma sejtek (WM35, WM278, WM3248) nagyobb mértékben osztódtak mint a kontroll sejtek. A metasztatikus sejtvonalakban (WM239A és 1205Lu) azonban nem észleltünk változást (14.A ábra). 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 (14. B,C ábra). A WM3248-N^{IC}-GFP sejtek esetében a kolóniák száma nem

változott ugyan, de a kolóniák mérete meglehetősen megnövekedett, azt mutatva, hogy a Notch-1 receptor aktivációja elősegíti a primer melanomák növekedését, valamint a primer melanomák kihorgonyzás nélküli (anchorage independent) sejtnövekedését. Ez utóbbi ismerten a malignus sejtek sajátossága.

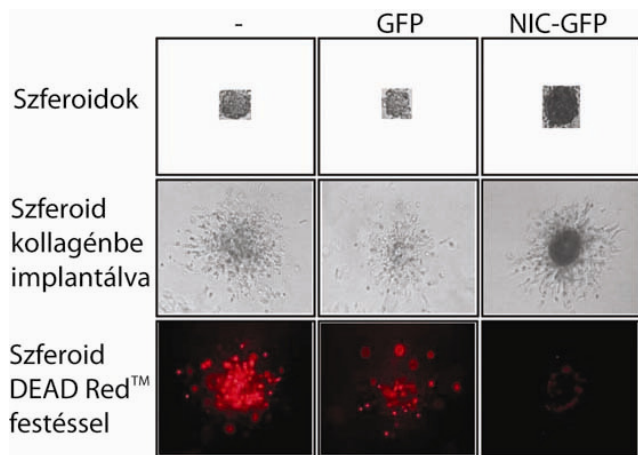


14. ábra: Az állandósult Notch-aktiváció fokozza a melanoma sejtek növekedését. A) ³[H]timidin inkorporációs vizsgálat, B) Kolónianövekedés vizsgálata agarban, kvantitatív eredmények, C) Kolónianövekedés agarban, inverz mikroszkópos képek (egység=500µm).

4.4.2.2 A sejtek túlélőképességére, apoptózisra kifejtett hatás vizsgálata háromdimenziós sejtkultúra modellben

Azon megfigyelésünk, hogy az aktív Notch-1 receptor a korai stádiumú melanoma sejteket képessé teszi kihorgonyzás nélkül, agarban is szaporodni, az azt sugallja, hogy Notch-1 ellensúlyozza a pro-apoptotikus jeleket. A következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a N^{IC} milyen hatással van a WM278 melanoma sejtek életképességére és növekedésére, ha azokat háromdimenziós szferoid formájában I-es típusú kollagénbe ágyazzuk. A szferoid technika egy új, jól ismert kísérleti rendszer, amelynek segítségével a daganatsejtek viselkedését a korábbi

modelleknél jóval alaposabban, a valóságos állapothoz közelebbi, háromdimenziós rendszerben lehet megvizsgálni.[89] A WM278-NIC-GFP és a WM278-GFP sejtekből készített szferoidokat I-típusú kollagénbe implantáltuk, majd 96 órán keresztül szérumtól és növekedési faktoroktól mentes tápfolyadékban inkubáltuk 37°-on. 96 óra elteltével a szferoidokon a LIVE/DEAD-(Invitrogen) fluoreszcens festést végeztünk. (a vörös - etídium homodimer-1 - szín az élettelen sejteket jelöli).



15. ábra: A funkcionálisan aktív Notch receptor fokozza a sejtek túlélőképességét és invazív növekedését három-dimenziós szferoid modellben.

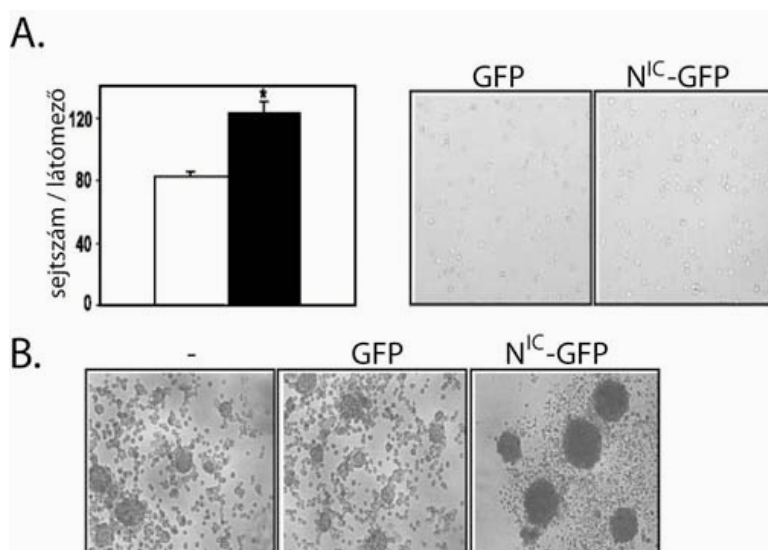
A vörös fluoreszcens jel az életképtelen sejteket jelöli. (LIVE /DEAD Viability kit).

A WM278-GFP sejt szferoidjaiban számtalan élettelen sejt volt látható (15. ábra), szemben a WM278-N^{IC}-GFP sejtekből álló szferoidokkal, ahol kevés apoptotikus sejtet láttunk. Itt a sejtek fokozott életképessége a szferoidok nagyobb méretében és a kollagénbe való migrációjukban is megnyilvánult. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a Notch-1 receptor aktivációja elősegíti a melanoma sejtek túlélését, fokozza a sejtek proliferációját, valamint a kollagéninvázió mértékét háromdimenziós sejt kultúra modellen.

4.4.2.3 A sejtadhézióra és a sejtadhéziós molekulák expressziójára kifejtett hatás vizsgálata

Mivel a sejtadhézió megváltozása fontos lépés a rák kialakulása, illetve progressziója szempontjából, ezért a következő lépésben a WM278-N^{IC}-GFP és WM278-GFP sejtek adhéziós kapacitását megpróbáltuk összehasonlítani kísérleti körülmények között. Egyenlő számú sejtet tettünk le mindkét sejtvonalból 24 lukú lemezbe, majd azokat 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A ki nem tapadt sejteket PBS-

sel való mosással eltávolítottuk, és a műanyag felszínhez kitapadt sejteket megszámoltuk. Amint az a 16.A számú ábrán látható, a N^{IC}-GFP sejtek erősebben kitapadtak, mint a kontroll(GFP) sejtek, azaz a Notch-1 receptor fokozta az adhéziónak képességüket. Hasonló eredményt értünk el akkor is, amikor a sejteket komplett tumormediumban tenyésztettük.

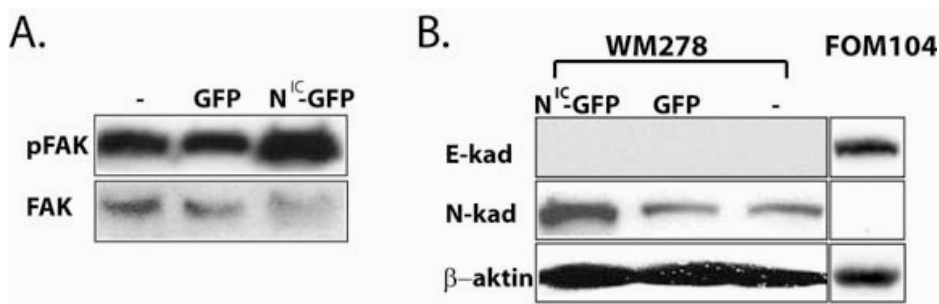


16. ábra: Aktív Notch-1 receptor fokozza a WM278 melanoma sejtvonal adhézióját. A) sejtkitapadás mérése, B) szferiodképződés (homofil adhézió) agaron.

A sejt-sejt adhézió mértékét is megvizsgáltuk oly módon, hogy 5000 melanoma sejtet helyeztünk 96-lukú lemezbe lukanként, ahol a lemez alját korábban 1.5%-os agarral befedtük a kitapadás megakadályozására, majd komplett tumor mediumban inkubáltuk 48 órán keresztül. Eredményül azt kaptuk, hogy a NIC-GFP sejtek a WM278-GFP-sejtekhez képest nagyobb, és szerkezetükben szervezettebbnek tűnő szferoidokat hoztak létre, ami egyértelműen a sejt-sejt adhézió mértékének növekedését jelenti. A fokozott intercelluláris kötődés olyan jeleket képes generálni, amelyek a sejtek túlélőképességének és szaporodásának - a tumorprogresszióval összefüggő két legfontosabb tulajdonság - fokozódását idézi elő. A következő lépésben azt teszteltük, hogy a Notch-1 aktiváció hogyan érinti a fokális adhéziónak kináz (FAK, jelátvivő molekula) működését. Ebből a célból a WM278-GFP- és NIC-GFP sejtekből nyert protein mintákon immunoblott analízist végeztünk a foszforilált (funkcionálisan aktív) FAK detektálására. (17.A) A

sejtdhéziós kapacitás növekedésével konzisztens módon a FAK foszforilációjának megemelkedését találtuk a WM-278-N^{IC}-GFP sejtekben a kontroll sejtekhez képest.

A megnövekedett sejtdhézió egyértelműen arra utalt, hogy a Notch-1 hatására változás történt az adhézióban résztvevő sejt felszíni fehérjék mennyiségében és/vagy működésében. Immunoblottal megvizsgáltuk az E-kadherin, az N-kadherin, a melanoma tumorigenitásával ismert kapcsolatban lévő, sejt felszíni molekulák fehérje-expressziójának mértékét. (17.B) Az E-kadherin fehérje nem volt kimutatható sem a WM278-N^{IC}-GFP, sem a WM278-GFP sejteken. N-kadherin esetében kifejezetten emelkedett fehérjeszintet találtunk a N^{IC}-GFP-vel fertőzött sejtekben a GFP-kontrollhoz, és az eredeti, (genetikailag nem módosított) sejtekhez képest. Korábbi irodalmi adatok szerint az N-kadherin képes a melanoma sejtek adhéziójának, migrációjának, túlélésének és szaporodásának szabályozására, és szerepet játszik a metasztázis képzés felgyorsításában[26].



17. ábra: Notch-1 receptor a FAK foszforilációját idézi elő és fokozza az N-kadherin szintjét A) Immunoblott a FAK és pFAK kimutatására WM278 sejtvonalban. B) Immunoblott E- és N-kadherin kimutatására WM278 VGP melanoma, valamint FOM104 melanocita sejtvonalban.

Összefoglalva, adataink azt támasztják alá, hogy a Notch-1 receptor aktivációja fokozza a melanoma sejtek adhézióját, mégpedig a FAK és az N-kadherin működésének manipulálásán keresztül.

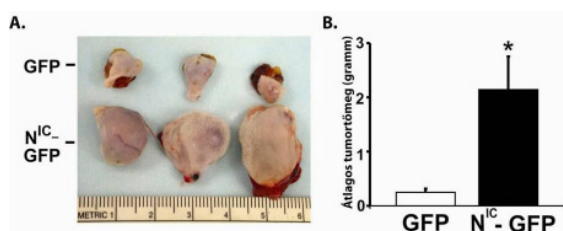
4.4.3 A konstitutív Notch aktiváció hatásának vizsgálata *in vivo*, a SCID egér modell segítségével

4.4.3.1 A SCID egerek jellemzői

A SCID CB-17, egy spontán scid mutáció révén létrejött egértörzs, melyet a Fox Chase Cancer Center-ben (Philadelphia, PA USA) fedeztek fel 1989-ben. A Prkdcskid mutációt homozigóta formában hordozó egerek nem rendelkeznek sem T, sem B-limfocitákkal, sem immunglobulinnal egy, a V(D)J recombinációt érintő rendellenesség következtében. Az egerek vakcinációra nem reagálnak ellenanyagtermeléssel. A CB-17 törzs tagjainak 20%-ában nagyon alacsony szinten detektálható valamennyi immunglobulin („leakiness”), ezen egérpéldányok a kísérletek előtt kiszűrésre kerülnek. A C.B-17 SCID egerek sajátossága, hogy bennük könnyen megfogannak idegen eredetű szövet transzplantátumok, mint pl. humán tumorok. Ezen tulajdonságuknak köszönhetően a rák elleni kezelések kipróbálásának egyik kedvelt állatmodelljévé váltak. A C.B.-17 törzs hasonlít a BALB/C egerekhez, annyi különbséggel, hogy a SCID egerek hordozzák a C57BL/Ka törzs Igh-1b allélját. Állatkísérleteinkben 8 hetes, immunglobulint ellenőrzötten nem termelő hím és női egyedeket használtunk.

4.4.3.2 Szubkután inokulált tumor növekedésének vizsgálata

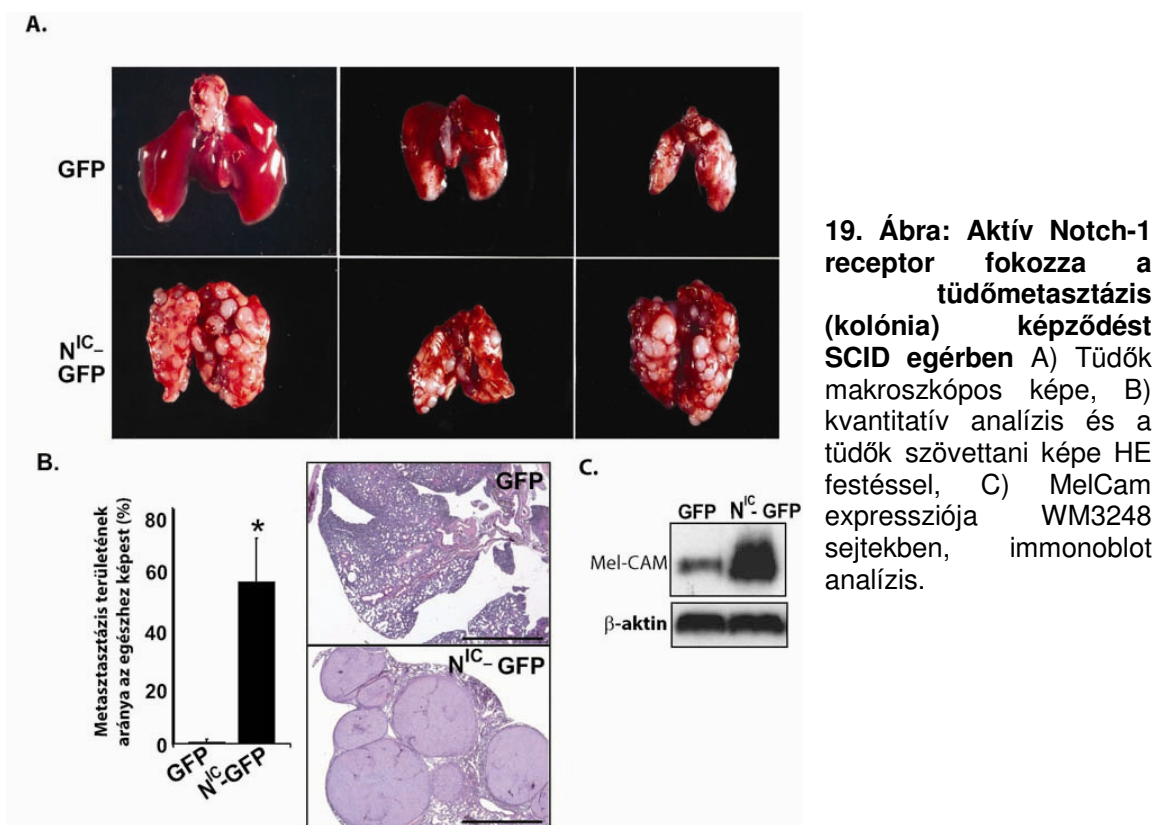
A Notch receptor működésének további vizsgálata céljából két N^{IC}-GFP-t stabilan expresszáló korai stádiumú melanoma sejt vonal (WM 35 és WM3248) SCID egérbe való beültetését terveztük. 3×10^6 WM35-N^{IC}-GFP és WM35-GFP sejtet injektáltunk SCID egerek bőre alá. (n=12 mindegyik csoportban) A tumormintákat a 7-ik hét végén begyűjtöttük, majd méretüket és súlyukat megmértük. Eredményként azt kaptuk, hogy a N^{IC}GFP tumorok a kontroll csoport (GFP tumorok) méretét hétszeres mértékben meghaladták (18.ábra), ezzel is alátámasztva azt az állítást, mely szerint a Notch-1 receptorok onkogénként működnek a melanoma esetében.



18.ábra. Aktívan működő Notch-1 receptor melanoma növekedését okozza SCID egérben A) tumorok makroszkópos képe B) tumorméret kvantitatív analízise. $p \geq 0,001$

4.4.3.3 Notch gén tüdőmetasztázis képződésre kifejtett hatása

Egy másik állatkísérletben azt vizsgáltuk, hogy a Notch-1 receptorok milyen hatással vannak a korai stádiumú melanomák progressziójára, a metasztázisképző képességükre. Ebből a célból 2×10^5 WM3248^{N^{IC}}-GFP és WM3248-GFP sejtet injektáltunk intravénásan, a farokvénán keresztül SCID egerekbe (n=12 mindkét csoportban), majd többhetes türelmi periódus után megvizsgáltuk a tüdőben kialakult metasztatikus göbök számát. 7 hét eltelte után (amikor az egerek generalizált állapota észlelhetően rosszabbodott) a kísérletet termináltuk (az egereken euthanáziát végeztünk), majd a tüdőket eltávolítottuk és disszekciós mikroszkóp alatt a tüdőben fellelhető metasztatikus csomókat megszámláltuk.



A WM3248-GFP egerek esetében a tüdőben csak néhány metasztatikus csomót találtunk, míg a WM3248-N^{IC} sejtekkel kezelt egereknél a tüdőt teljes egészében ellepő, számtalan metasztatikus képződménnyel szembesültünk. (19.A)

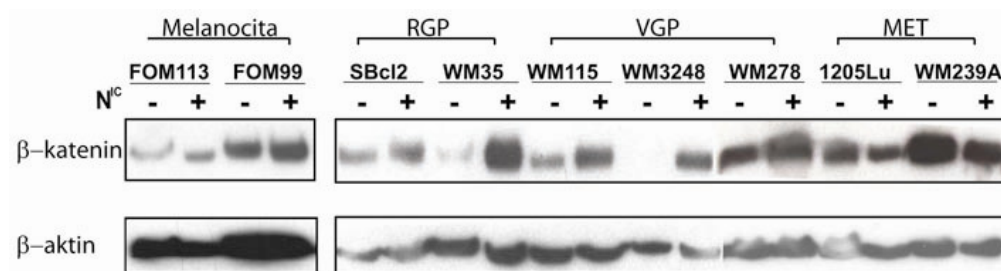
Mindez azt jelentette, hogy a Notch-1 receptor konstitutív aktivációja a korai stádiumú melanoma sejteket egy malignusabb, metasztázis létrehozására fokozottabban képes fenotípus irányába mozdította el. A tüdőmetasztázis képződésének fokozódása többek között azzal is magyarázható, hogy az extravazációban, a homing-ban, a melanoma sejtek kitapadásában, illetve teljes adhéziójában szerepet játszó adhéziós molekulák közül egy vagy több a Notch-1 receptor hatására fokozottabban termelődik vagy működik. Megpróbálkoztunk ezek identifikálásával is, és azt találtuk, hogy a N^{IC}-GFP-el transzfektált WM3248 melanoma sejtekben a Mel-CAM (melanoma associated adhesion molecule) szintje a Notch aktiváció hatására nagymértékben megemelkedik. A fokozott Mel-CAM expresszió hatásának és pathomechanizmusának vizsgálata további kísérletek sorozatát kívánja, mi erre jelenlegi munkánk keretében nem vállalkoztunk. Mindenesetre ezen eredményeink elegendőnek bizonyultak hipotézisünk alátámasztására.

Ezen eredményeket összefoglalva, ezen kísérleti adatok alapján elmondhatjuk, hogy a Notch-1 jelátvivő útvonal szerepet játszik a rák kialakulásában, valamint a primer melanomák progressziójában.

4.5 Notch receptor aktiválódásának hatása a β -katenin molekula stabilizációjára

4.5.1 A β -katenin fehérje expressziója Notch aktivációt követően

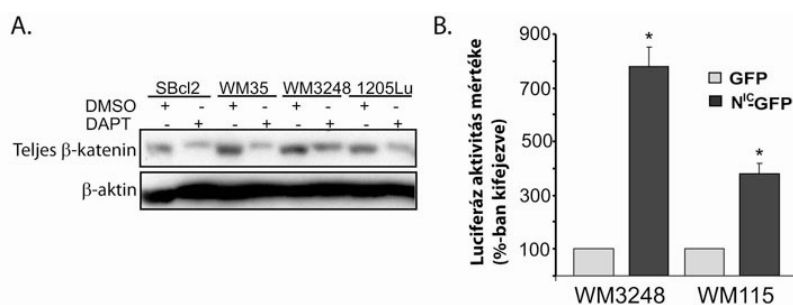
A következő lépésként szeretnénk megérteni, hogy a Notch-1 receptor milyen mechanizmuson keresztül befolyásolja a melanoma növekedését. Számos potenciális intracelluláris molekulát számbavettünk. A β -katenin fehérjére Nicolas és mtsai-nak a Notch szerepét a bazálsejtes karcinómában vizsgáló, 2003-ba megjelent közleménye hívta fel a figyelmünket. Amikor a β -katenin fehérje expresszióját teszteltük, az aktív N^{IC}-et expresszáló melanoma sejtekben meglepő észrevételt tettünk. A N^{IC}-GFP-lenti-vel transzfektált korai stádiumú melanoma sejtekben (Sbcl2, WM35, WM115, WM3248 és WM278) a β -katenin fehérje mennyisége jelentősen megemelkedett volt a GFP-(kontroll) sejtekhez képest (20.ábra). A metasztatikus melanoma sejtekben nem észleltük ezt a változást, ami ismét a Notch tumorstádiumtól függő működésére utalt.



20. Ábra: B-katenin expressziójának mértéke aktív Notch-1 receptorműködés esetén. Immunoblot. A β-aktin kontrollként szolgál a fehérjemennyiség ellenőrzésére.

4.5.2 A Notch-1 receptor aktiváció gátlásának hatása a termelődő β-katenin szintjére

A Notch-1 β-katenin-t szabályozó hatásának ellenőrzésére a Notch érését blokkoltuk DAPT-val (1μM) az eredeti -genetikailag módosíthatatlan- melanoma sejteken, majd Western blottal ellenőriztük a β-katenin fehérje szintjét. Kontroll kezelésként a DAPT oldószere (DMSO) szolgált. Ezen kísérlet során azt találtuk, hogy DAPT kezelés (1μM) csökkenti a β-katenin fehérje termelődését (21.A ábra), azaz a Notch működésének gátlásával a β-katenin szintje csökkenthető.



21. ábra. β-katenin expressziója a Notch érésének követően csökken. A) β-katenin fehérje szintje, immunoblot technika. B) β-katenin funkció mérése luciferáz teszttel két melanoma sejtvonalban.

4.5.3 A termelődött β-katenin fehérje funkcionálisan aktív

Meg kellett bizonyosodnunk arról is, hogy a Notch receptor által indukált β-katenin fehérje aktívan működik-e, részt vesz-e a sejtek működésének további szabályozásában, avagy csak a sejtek inaktív fehérje komponenseinek számát gyarapítja. Ezt a TCF-luciferáz teszttel tudtuk ellenőrizni. A human T-sejt faktor-1

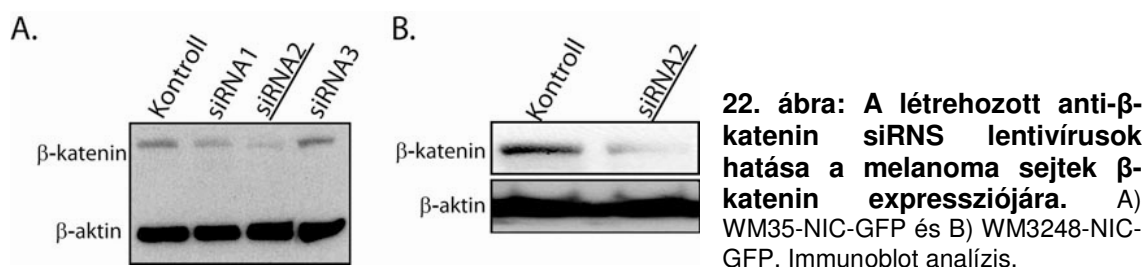
(TCF) gén ismerten egy, a β -katenin által szabályozott génszakasz. Amennyiben erről a génszakaszból mRNS kerül átírásra, -azaz a β -katenin működőképes, és szabályozza a TCF működését-, akkor az e célból a sejtbe juttatott TOPflash-Reporter plazmid révén ezzel egyidőben luciferáz is enzim termelődik, aminek a mennyisége (ami TCF szintjével arányosan) a luciferin szubsztrát hozzáadása után kvantifikálható. Ezen kísérletünk azt mutatta, hogy a WM3248-N^{IC}-GFP és WM115-N^{IC}-GFP sejtekben az aktívan működő TCF mennyisége jelentősen nagyobb mint a GFP-vel módosított, kontroll sejtekben, azaz a Notch hatására termelődő β -katenin a melanoma sejtekben működőképes. (21.B ábra)

4.6 β -katenin szupressziójának hatása a humán melanoma sejtek növekedésére in vitro és in vivo

4.6.1 Kis interferáló RNS lenti-vírus vektor létrehozása

A fenti eredmény további ellenőrzése végett azt tűztük ki célul, hogy megpróbáljuk gátolni a β -katenin fehérje termelődését a NIC-GFP-vel módosított sejtekben, hogy lássuk, mennyire szükséges a β -katenin fehérje a Notch onkogén funkciójának a megvalósításához. 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 olyan módon, hogy specifikusan β -katenint célzó, rövid, hajtű (short hairpin)-RNS szakaszokat kódoló DNS szakaszokat illesztettünk be az H1UG expressziós vektorba a BamH1 és az Xho1 hasítóhelyek közé, amik ezáltal a H1 promotor kontrollja alá kerültek. Ezek felhasználásával ezután rekombináns lentivírust hoztunk létre a melanoma sejtek megfertőzése céljából a már korábban leírt módon. A létrehozott siRNS-t kódoló lentivírossal a melanoma sejteket megfertőztük (a begyűjtött vírust tartalmazó felülszót normál tápfolyadékkal 1:5 arányban hígítva). A három siRNS vírus közül egy vírus különösen hatásosnak bizonyult a β -katenin „kiütésében”, ezért későbbi kísérleteinkhez ezt a vektort választottuk. (22. A és B ábra) Ennek a β -katenin

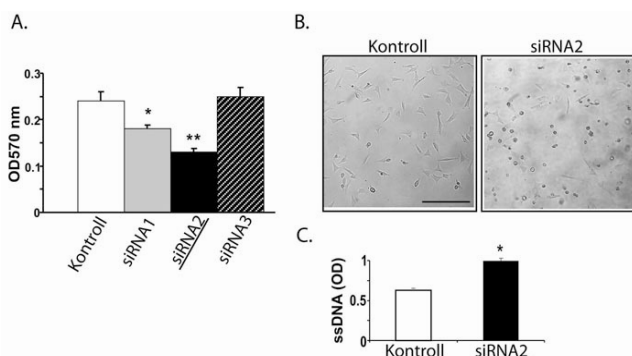
mRNS-ét célzó kis interferáló RNS-hez tartozó DNS szekvencia a következő: 5'-GCAAGCTCATCATACTGGC-3'. A 3'-as végződésnél található citozin-t timidinre cseréltük, hogy az antiszensz hajtú RNS-sel való kapcsolódása során egy „G:U wobble” bázispár alakuljon ki, ami korábbi vélemények szerint növeli a géncsendesítés hatásosságát.



Ezután a WM35-N^{IC}-GFP és WM3248-N^{IC}-GFP sejtvonalakat megfertőztük a kis interferáló RNS-t tartalmazó, permanens változást létrehozó lentivíussal, ezáltal két újabb stabil sejtvonalat 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 sejtvonalakban immunoblottal ellenőriztük le, ahol annak, a kontrollhoz képest 78%-os (WM35), illetve 90%-os(WM3248) csökkenését tapasztaltuk.(22. ábra)

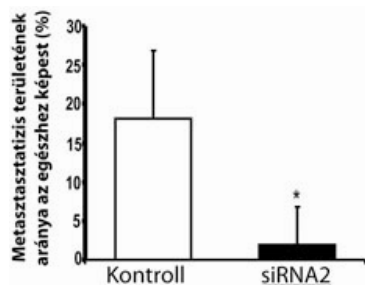
4.6.1.1 A csökkent β -katenin szint hatása a melanoma sejtek életképességére

Ezután azt próbáltuk megvizsgálni, hogy a β -katenin gátlása elegendő-e a Notch-1 receptor általi, a melanoma sejteken előidézett sejtnövekedés, valamint a metasztatikus fenotípus visszafordítására. Ahogyan azt a 23. ábrán látjuk, a β -katenin szupressziója szignifikánsan csökkentette a melanoma sejtekben a Notch-1 által indukált sejtprolifерáció mértékét. Ennek egyik magyarázata lehet a programozott sejthalál, az apoptózis indukciója, ugyanis az apoptózis mértékét megvizsgálva (ssDNS teszt) azt találtuk (23.C ábra), hogy a csökkent β -katenin szinttel egyidőben növekszik az életképtelen sejtek száma.



4.6.1.2 Tüdőmetasztázis-képzésre kifejtett hatás vizsgálata SCID egérben

A következő kísérletünkben a β -katenin gátlásának a metastázis képzésre kifejtett *in vivo* hatásáról szeretnénk volna meggyőződni. Ebből a célból SCID egerekbe 4×10^5 β -kat-siRNS/WM3248-N^{IC} vagy H1UG/WM3248-N^{IC} sejtet fecskendeztünk be intravénásan a farokvénán keresztül (n=4). A 12-ik héten a kísérletet termináltuk, az egerek tüdejét eltávolítottuk, majd a tüdők felszínén látható metastatikus csomókat disszekciós mikroszkóp alatt megszámoltuk, illetve a szövettani metszeten a daganatos terület arányát az egészhez képest meghatároztuk.



17.Ábra. β -katenin gátlása siRNS-el csökkenti a tüdőkolonizáció mértékét SCID egerekbe 4×10^5 β -kat-siRNS/WM3248-N^{IC} vagy H1UG/WM3248-N^{IC} sejtet fecskendeztünk be iv (n=4). A kísérlet végén tüdők szövettani metszetén a daganatos terület arányát az egészhez képest meghatároztuk.

A kísérlet eredményeképpen azt kaptuk, hogy a β -kat-siRNS/WM3248-N^{IC}-el injektált egerekben jelentősen kevesebb metastázis alakult ki a tüdőkben a kontroll egerekhez képest. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a Notch-1 receptor onkogén hatása melanoma sejtekben minden bizonnyal /legalább/ részben 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 a melanoma sejtekben.

5 Megbeszélés

A melanoma malignum incidenciája folyamatosan nő. A melanoma a leggyakrabban előforduló ráktípus a 20-29 éves férfiak és nők korcsoportjában. A betegség leghatékonyabb kezelése továbbra is a sebészeti kimetszés, ami azt jelenti, hogy az elmúlt 30 év kitartó orvosi kutatásai ellenére sem sikerült az előrehaladott melanomák ellen hatásos terápiás megoldást kifejleszteni.

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 tumormodelleken. Reményeink szerint ezúton sikerült rámutatnunk egy új molekulára, amely ellen kifejlesztett terápiás ágens akár a melanoma kezelésében is szerepet nyerhet.

5.1 A funkcionálisan aktív Notch-1 receptorok expressziójának vizsgálata, humán melanocita és melanoma sejtvonalakon, illetve humán naevus pigmentosus és melanoma malignum szövetmintákon.

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 detektálható.

Megfigyelésünkkel egyező adatokat közöltek Nickoloff és mtsai, akik azt találták, hogy mind a négy Notch receptor intracelluláris alegysége kimutatható primer melanoma malignumos szövetmintákban[90], de a receptor jelenlétét ők sejtvonalakon nem vizsgálták. A közleményükből nem derül ki, hogy több Notch receptor szimultán aktivációja avagy specifikusan egy vagy két kiválasztott Notch receptor aktivációja történt meg a vizsgált szövetmintákban. Hendrix és mtsai 2002-

ben kimutatták a Notch-3 és -4 receptor jelenlétét humán melanomákban, és felvetették a többi Notch receptor esetleges szerepét is[91]. A Notch-1 expresszióját hematológiai tumorokban, cervix rákban, fül-orr-gégészeti, vese, tüdő, emlő és pleurális eredetű daganatokban többszörösen megerősítették. 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. Azt találták, hogy a Notch-2 gén upregulálódott a melanoma malignumos mintákban a naevus pigmentosushoz képest[92]. Ezen kívül azt is megállapították, hogy ezzel egyidőben a HEY-1 gén expressziója is megnőtt, ami a mi megfigyelésünkhöz hasonlóan azt támasztja alá, hogy a Notch jelátvivő útvonal aktívan működik humán melanoma malignumban.

Ezen kísérletes munka során a Notch-1 szignálrendszer vizsgálatát tűztük ki célul azért, mert a Notch-1 aktivációja kimutatható az emberi melanoma sejtvonalakban, és a szövetmintákban, továbbá amiatt, hogy ennek szintje sokkal nagyobb fokú, mint az a melanocitákban és naevus pigmentosban tapasztalható. Tudományos adataink szerint a Notch-1 receptor a melanoma progresszió folyamatának fontos szabályozó eleme, ennek ellenére a többi Notch-receptor esetleges szerepét sem zárjuk ki.

5.2 A Notch-1 receptor gátlása, és a gátlás utáni hatás tanulmányozása a melanoma sejtek növekedésére *in vitro* és *in vivo*.

A tumorok progrediálásának folyamata egy komplex folyamat, amihez számos különböző, celluláris szinten zajló változásra van szükség, mint pl. fokozott sejtprolifерáció, a túlélőképesség, migráció, invázió, stb. Mi a sejtprolifерációt és a sejtek kihorgonyzás független növekedését vizsgáltuk agarban. A Notch receptor működésének befolyásolására több lehetőség és módszer áll rendelkezésre. A Notch-1 receptorok működését sejtvonalakban blokkolva (mindkét módszerrel) azt

találtuk, hogy a melanoma sejtek proliferációja és a kihorgonyzásfüggetlen növekedése agarban gátolható. A Notch gátlására egy γ -szekretáz inhibitor, a DAPT-t alkalmaztunk, amelynek Notch működést gátló hatását már korábban felismerték [93, 94]. A DAPT szerencsére könnyen beszerezhető, a használata egyszerű. Mivel a farmakológiai inhibitorok sok esetben kifogásolhatók a specifikusság szempontjából (a preszenilin a Notch érésének gátlása mellett több protein és útvonal működésére kihathat), egy második módszert is alkalmaztunk, ami kizárólagosan a Notch útvonalat gátolja. A Mastermind-like transzkripció faktor kizárólag a Notch jelátvivő útvonal működésében vesz részt [43, 95], így a funkcionálisan inaktív Mastermind alkalmazását követően biztosak voltunk állításaink helyességében. Suwanjune és mtsai szintén beszámoltak arról, hogy ha a Notch rendszert γ -szekretáz inhibitorral gátolják, a sejtproliferáció gátolható lymphoma és hepatoma sejtvonalakban[96]. Zang és mtsai emlőrákban közöltek hasonló eredményeket [97].

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 [98]. Számos sejttypusban a kihorgonyzásfüggetlen növekedés egyet jelent a tumorigenitással és invazivitással mint pl. a kissejtes tüdőrákban[99]. Ha egészséges sejteket meggátolnak abban, hogy más sejtekhez kapcsolódjanak, azokban beindul az apoptózis. 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. Sjolund és mtsai is arról számoltak be, hogy a tumorsejtek kihorgonyzásmentes növekedése és invazivitása gátolható DAPT-vel veserák eredetű sejtvonalban[100].

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 bazális és laphám sejt karcinómában (egérmodellben) mások a Notch 1 receptort tumorellenes hatásúnak találták. [67, 101] Ezt az is alátámasztja, hogy a Notch receptorok a bőr eredetű karcinómákban csak kis mennyiségben mutathatóak ki [102]. Már korábban kimutatták, hogy a Notch szignálrendszer nagyon sokféle -pozitív és negatív- szerepet játszhat a sejt differenciálódás, a sejtproliferáció, és a sejtek életképességének szabályozásában, valamint a tumorgenezis során. Ezért nem meglepő az, hogy ugyanazon szervből kiinduló, de különböző típusú malignóma esetében, mint a pl. bazálsejt karcinóma és a melanoma malignum, a Notch-receptor ellenkező hatást vált ki. Például a B-sejtek fejlődése során a Notch-1 növekedésleállást és apoptózist okoz [103], míg T-sejtekben sejtproliferációt indukál [104]. A Notch szignálrendszer egyrészt onkogénként viselkedik, és a sejteket proliferációra serkenti mint például akut lymphoblastos T-sejt leukémiában [57], egér emlőtumorban [105] és transzformálódott veseepithelsejtekben [106], másrészt pedig tumorszuppressorként a sejtnövekedés ellen hat, mint például egér bazálsejt karcinómában [67], kissejtes tüdő tumorokban [107], hepatocelluláris karcinómában [64] és prosztatákban [108]. A Notch receptorok a HPV okozta celluláris transzformációval ellentétes irányban hatnak cervix tumorokban, amely antitumor hatás nagy valószínűséggel a MAML1 molekulán keresztül megy végbe [43]. Sajnos a Notch receptorok kettős működésének pontos szabályozása nem ismert, azt azonban tudjuk, hogy a Notch receptorok által kiváltott hatás a szignál erősségének, az időzítésnek és a sejt típusnak a függvénye [109].

Következtetésül megállapítjuk, hogy a Notch-1 útvonal egy aktív mechanizmus a melanoma sejtek működésének szabályozásában. A Notch-1 receptor gátlásával az RGP és VGP melanoma sejtek proliferációja és kihorgonyzásmentes növekedése gátolható.

5.3 A funkcionálisan aktív Notch-1 receptor emlős expresszióra alkalmas vektor konstruktjainak, és rekombináns lentivírus konstruktjának előállítása. A Notch-1 aktív formájának overexpresszálása humán melanoma és melanocita sejtvonalakon.

Génszintű alaputatások során érdekes lehet egy adott gén ektópiás, ill. fokozott vagy éppen csökkent expressziójának vizsgálata. A széles körben használt tranziens expressziót adó módszereknél (mint pl., plazmid vagy adenovírus használata) többet nyújthatnak a tartós expressziót biztosító vektorok. Erre a célra gyakran használnak módosított, mesterségesen előállított virális vektorokat. Közülük is kitűnnek a lentivirális (HIV-1 alapú) vektorok, ugyanis ezek univerzális fertőzőképessége, alacsony toxicitása és nagyfokú rugalmassága ideálissá teszi azokat orvosi biológiai kutatásokra. Lentivirális vektorokkal sikeresen fertőzhetők a legkülönbözőbb emlős sejtvonalak és primer sejtek, osztódó és nem-osztódó állapotban egyaránt. A vírusok által a célsejt genomjába integrált transzgének jelenléte permanens, a transzgén expressziója stabil és az utódsejtek osztódáskor öröklik a beépített génszekvenciát. Az így létrehozott transzgenikus sejtek rendkívül stabil, hosszú távú transzgén expressziót mutatnak [110, 111].

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, az aktív Notch receptor permanens expressziójának előidézése céljából. A proteinexpresszió sikerességét a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat és Western blot is alátámasztotta. A genetikailag módosított sejtek létrehozásával lehetőséget teremtettünk arra, hogy a Notch-1 aktiváció szerepét in vitro és egérmodellben tovább vizsgálhassuk.

5.4 A Notch-1 túlzott mértékű expressziója (overexpresszió) általi hatás vizsgálata a melanoma sejtek proliferációjára, illetve kihorgonyzás-független növekedésére. A konstitutív Notch aktiváció hatásának vizsgálata *in vivo*, SCID-egér modellen.

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 malignumban a sejtproliferációt és a kihorgonyzás-független növekedést fokozza, és ez a hatás kísérleteinkben stádiumfüggő karakterisztikát mutat. A Notch-1 hatása elősegíti a primer melanomák progresszióját, de nincs, vagy nagyon kis hatással van a metasztatikus melanomákra. Számos, más ráktípust tanulmányozó közleményben közöltek hasonló adatokat. Sjolund és tsai veserákos sejteken expresszálta a NIC-t lentivirális vektorral, Zhang és tsai osteosarcoma sejteken alkalmazott retrovirális vektort[112]. A Notch-1 konstitutív expressziója mindkét daganattípusban fokozta a sejtproliferációt. A proliferáció hátterében természetesen több dolog állhat. A legvalószínűbb, hogy a Notch-1 receptor aktivációja a sejtciklusban részt vevő proteinek (pl. ciklin D1) expresszióját szabályozza. Egy, a laboratóriumunkban végzett korábbi tanulmányban (közlésre beküldve[113]) azt találtuk, hogy a Notch-1 elősegíti a humán melanociták növekedését, és akár malignusan is transzformálhatja azokat. A Notch általi tumoros transzformációhoz valószínűleg több genetikai változás egyidejű megléte szükséges[114, 115]. Cervix carcinómában is kimutatták a Notch receptorok stádiumtól függő működését. A Notch-1 receptor a cervix rák korai stádiumában onkogénként[116], a késői stádiumában pedig tumorszuppresszorként viselkedik[60]. 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.

A tumorok progrediálásának folyamata egy komplex folyamat, amihez számos különböző, celluláris szinten zajló változásra van szükség, mint pl. fokozott sejtproliferáció, a túlélőképesség, migráció, invázió, stb. Ennek a komplex

folyamatnak a kísérletes tanulmányozására az *in vivo* (egér) modellek a legalkalmasabbak. A SCID-egérrel végzett kísérleteink során azt találtuk, hogy a Notch-1 aktiváció tumornövekedést okoz szubkután inokulált melanomában.

A metasztázis kialakulása egy kaszkád jellegű folyamat. Először a daganatsejtek lokális inváziója történik meg a környező szövetekbe, majd az erekbe való behatolás, az intravazáció, aztán az erekben és nyirokrendszeren keresztül történő eljutás a célszervekbe következik. Ezt az extravazációt követi, illetve az idegen szervben történő megtapadás, aminek az eredménye egy új, tumoros terület létrehozása[22]. Az általunk használt mesterséges, „metasztázis képzés” kísérlet ennek a folyamatnak az utolsó lépéseit tükrözi. Úgy tűnik, hogy a Notch szignálrendszer a kezdeti lépésekre, mint pl. a tumorsejtek lokális inváziójára és az extravazációra, nincs hatással. Ha szubkután fecskendeztünk be a SCID egerekbe 3248N^{IC}-tumorsejteket, a 12 hét eltelte után nem találtunk tüdőmetasztázist az egerekben. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a Notch-1 receptor a melanoma sejtek távoli szervekbe történő homing-jának, kihorgonyzásának és kitapadásának egy vagy több lépését szabályozza, amit adhéziós molekulák szintjének szabályozásával is elérhet.

5.5 A Notch-1 overexpresszió hatásának tanulmányozása a sejtheadhézióra, egyes adhéziós molekulák expressziójára, valamint apoptózisra háromdimenziós szferoid modellen.

A bőr homeosztázisában a melanociták növekedését az azokat körülvevő keratinociták szabályozzák különböző parakrin faktorok és adhéziós molekulákon keresztül[117]. Tumorgenezis során a keratinociták ezen kontrollja a melanociták felett megszűnik az E-kadherin molekula downregulációja miatt[118]. Az E-kadherin eltűnésével egyidőben általában megnő az N-kadherinek mennyisége. Ez a jelenség az úgy nevezett „kadherin-váltás”, aminek a révén a melanoma sejtek kommunikálni tudnak egymással és az őket körülvevő dermális fibroblasztokkal. [26] Az E-kadherin-ről az N-kadherin-re történő átváltás valószínűleg fontos sejtmotilitást és túlélőképességet érintő növekedési előnyökhöz jutattja a korai stádiumú tumorsejteket.

Munkánk során kimutattuk, hogy Notch-1 aktivációt követően megnő a melanoma sejtek adhézíós 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, és bebizonyítottuk, hogy Notch-1 a fokális adhézíós kináz aktiválódását idézi elő. Az N-kadherin szintjének megemelkedése egy a lehetséges mechanizmusok közül, amelyek a Notch-1 aktiváció esetén a sejtnövekedés, migráció, adhézio fokozódásához vezetnek. A kadherineknagy protein komplexek részei, amelyek számtalan folyamat szabályozásában, mint pl. sejt adhézio, sejt morfológia, intracelluláris jelátvivő folyamatok vesznek részt[119]. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy homotípusos kadherinen alapuló sejtadhéziót követően a kadherinekn közvetlenül szabályozzák a jelátvitel folyamatát a Rho és Rac, Cdc42 kis GTPázok [120] és a PI3kináz-Akt [121] aktiválásán keresztül. 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 megvizsgálva azt találtuk, hogy a Notch-1 aktiváció fokozta aktív, foszforilált állapotú FAK kinázok mennyiségét.

Közleményünk megjelenését követően Bedogni és tsai bizonyították, hogy a Notch-1 gátolja az apoptózist melanoma sejtekben: a NIC inhibíciója fokozta a kaspáz-3 termelődését melanoma sejtekben[122].

5.6 A Notch-1 overexpresszió hatásának tanulmányozása a β -katenin fehérje (mint lehetséges „downstream” target molekula) szintjére.

Egy korábbi hivatkozó 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[67, 123]. Melanoma malignum esetén mi azt találtuk, hogy a β -katenin fokozott működése a Notch-1 receptor onkogén hatásának közvetítője. A β -katenin eredményeink szerint onkogén funkciót is képes ellátni a tumorgenezis során. A β -katenin okozta hatás onkogén vagy tumor-szupresszor jellege egyértelműen a Notch-1 aktivációtól függ, illetve a Notch-1-nek az illető

szövetben betöltött szerepe határozza meg. Mindez azt sugallja, hogy a Notch-1 receptor működésének a jellege (onkogén vagy tumorszupresszor) a bőr eredetű rákokban a szignáltranszdukció során a β -katenin feletti szinten kerül eldöntésre. A β -katenin molekulának mutáció általi aberráns aktiválódását [124], a vad típusú β -katenin fehérje nagy mértékű nukleáris felhalmozódását [125], vagy az IGF-szignaling okozta stabilizációját [126] már korábban is összefüggésbe hozták a melanoma progresszió folyamatával. β -katenin nagyon fontos szerepet játszik az E- és N-kadherin - Ca^{++} -függő sejt felszíni molekulák - mediálta sejtadhézió szabályozásában. A β -katenin nagyon fontos része a Wnt jelátvivő útvonalnak is, ahol a TCF/lymphoid enhancer-binding factor-regulated (TCF/LEF-regulated) gén transzkripcióját indukálja. Mint korábban említettük, a β -katenin fehérje szintjének, illetve a TCF/luciferáz aktivitásnak a megemelkedése utal arra, hogy a β -katenin stabilizálódott, az mRNS szint megemelkedése nem. A β -katenin molekula Notch aktiváció által végzett szabályozása többféle úton történhet: vagy a Wnt útvonallal való párbeszéd révén vagy pedig az N-kadherin szabályozásán keresztül. Ha ez utóbbi a válasz a kérdésre, akkor ez a N^{IC} -et expresszáló melanoma sejtekben észlelt nagy mértékű sejtproliferációra, anti-apoptotikus hatásra és metasztatikus aktivitásra is magyarázatot adhat [26].

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. Mint azt korábban is megemlítettük, ennek magyarázata az lehet, hogy a Notch-1, és a receptor targetgénjei a NIC overexpressziója nélkül is megtalálhatóak a metasztatikus melanoma sejtvonalakban. Ha ezen felül, külsőleg tartós Notch1 aktivációt idézünk elő, az már nem képes a β -katenin fehérje szintjének növekedését előidézni, és képtelen a sejtproliferáció fokozására. Valószínű, hogy a metasztatikus sejtekben már minden onkogén hatású útvonal aktiválva van, az alsóbb rendű elemek, mint például a β -katenin vagy a sejt-ciklus gépezete már maximális kihasználtságon működnek, és teljesítményük tovább már 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

rendszerhez való kapcsolódásának jelentőségét az adja, hogy ezen a molekulán keresztül két fontos jelentőségű sejten belüli szabályozórendszer: a Notch és a WNT útvonal kapcsolódik össze. Felvetéseink helyességét igazolta Alves-Guerra és mtsai közleménye, akik kimutatták hogy a MAML-1 nem csak a Notch-1 receptor, hanem a β -katenin útvonal koaktivátora is[127, 128].

5.7 A β -katenin molekula expressziójának gátlása, és a sejtproliferációra, apoptózisra és tumorgenezisre kifejtett hatás tanulmányozása a permanensen aktív Notch-1 receptorral rendelkező melanoma sejtekben.

A Notch-1 receptor (aktiválódását követően) a β -katenin molekulán keresztül hatva, a tumor stádiumától függően onkogénként viselkedik, és elősegíti a primer melanomák progresszióját.

Az RNS-interferencia (RNAi) egy pár éve felfedezett jelenség, egy univerzális szabályozó mechanizmus, amely azon alapul, hogy a Dicer fehérje felismeri a kettős szálú RNS spirált és azt lebontva egy önkatalizáló folyamatot indít el. A duplex lebontásával keletkező kis kétszálú RNS darabok (siRNA) egy másik fehérjéhez (Slicer) kapcsolódva egyszálúvá alakulnak, egy RNAi silencing complex-t (RISC) hoznak létre. A RISC képes felismerni a kis RNS darabbal komplementer mRNS molekulákat és azokhoz kötődve katalizálni lebontásukat. Ez az epigenetikus változás bizonyítottan öröklődő [129]. A kis interferáló RNS-t kódoló génszakaszok virális vektorba való beépítése az orvosbiológiai kutatások egy új, génexpresszió gátlására alkalmas módszerét teremtette meg[130].

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 növekedésének csökkenéséhez vezet *in vitro* és *in vivo*, valamint a egyszálú DNS (ssDNS) felhalmozódásához vezet melanoma sejtekben, azaz apoptózist indukál. Következtetesként elmondhatjuk, hogy a β -katenin működése szükséges a melanoma sejtek növekedéséhez.

Állításunkat alátámasztja Delmas és csoportjának publikációja, akik kimutatták, hogy a β -katenin a melanocitákban immortalizációt okoz a p16/Ink4a szupresszállásán, és a Ras-sal való ko-operáláson keresztül [131].

5.8 A Notch jelátvivő útvonal modulálásának lehetőségei és esélye

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 metasztázisok kialakulásához vezethet. A daganatokra individuálisan jellemző genetikai eltérések célzott kezelése lassan ugyan, de egyre inkább teret nyer a terápiás lehetőségek között. Ezek nagyobb részt növekedési faktorok, azokkal kapcsolatban lévő kinázok, illetve anti-angiogenetikus növekedési faktorok ellen kifejlesztett farmakológiai inhibitorokat vagy antitesteket jelent.

Az eukarióta sejtek nagyon komplexen működő, és érzékenyen reagáló rendszerek. Az evolúció a sejtek „élet vagy halál” döntéseinek kontrollálására egy erőteljes szabályozórendszert hozott létre, amely stabilan működik akkor is, ha egy vagy két elemének működése kiesik. Sajnos, ezt a pontosan és szigorúan működő rendszert kavarja fel a malignus transzformáció, illetve a rákos sejtek genetikai instabilitása, lehetetlenné téve a rák elleni kezelés egyszerű kifejlesztését [132]. Nem minden növekedési faktor és sejtfelszíni receptor egyforma jelentőségű. A legfontosabbak azok az útvonalak, amelyek a differenciálódást, sejt proliferációt és a sejthalált szabályozzák, azaz a WNT, Sonic-Hedgehog és Notch útvonalak. Az igazi ok, amiért a Notch-útvonal elleni gyógyszerek kifejlesztése felmerült az az, hogy Notch-1 a korlátlan osztódási kapacitással rendelkező, terápia rezisztens daganat őssejtek[133] eliminálásában segídezhet.

A Notch jelátvivő útvonal gátlásának felmerülő módjai: a Notch-ligand kapcsolódás modulálása (pl. anti-Dll4 ab[134], receptor-decoy[135]), a ligand ubikvitinálás gátlása ([136]), Notch receptor fukoziláció gátlása[137], Notch receptor érésének (ADAM17[138], γ -szekretáz [139]) gátlása, illetve a sejtmagban kialakuló transzkripciós komplexek hatástalanítása[140]. A γ -szekretáz inhibitorok közül néhány már a klinikai kipróbálás korai szakaszában van. Az antitestek közül pedig

egy, amelynek az alkalmazása a Notch-receptort inaktív konformációba kényszeríti, kifejllesztés alatt áll[141]. A hosszútávú terápiás siker ritkán érhető el monoterápiával, még a kritikus jelentőségű Notch útvonal elleni kezelés is meg fogja kívánni a kombinációs terápia kifejllesztését. A legvalószínűbb kombinációnak a kemoterapeutikum+ Notch inhibitor, a Notch inhibitor+PI3Kinase-AKT-mTOR inhibitor, a Notch inhibitor+NfKB inhibitor, illetve a Notch inhibitor+proteoszoma inhibitor ígérkezik. Ezeknek a kombinációs kezeléseknek a kifejllesztése hosszadalmas és aprólékos folyamat, amelyek az individualizált medicina felé nyitják majd meg az utat.

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 receptorról 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, sejtproliferáció 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 út vonal 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 Summary

Notch-1 receptor is a highly conserved transmembrane protein that determines differentiation, proliferation and survival during embryogenesis. Upon ligand activation, the receptor is cleaved by metalloproteases, and then its intracellular domain translocates to the nucleus, and induces subsequent activation of target gene transcription. Involvement of Notch signaling in several cancers is well known, but its role in melanoma remains poorly characterized.

In our work, we studied the role of the Notch-1 receptor and the Notch signaling in the progression of melanoma. Here we show that the Notch-1 receptor is expressed in human melanoma malignum tissue specimens, and that the Notch1 pathway is activated in human melanoma. We have showed that blocking Notch signaling suppressed the proliferation of primary melanoma cell lines. We have demonstrated that constitutive activation of the Notch1 intracellular domain enhanced the primary melanoma cell growth both in vitro and in vivo, as well as enhanced their anchorage independent growth, yet had little effect on metastatic melanoma cells. We have found that activation of Notch1 signaling enabled primary melanoma cells to gain metastatic capability. Notch1 activation increases tumor cell adhesion, up-regulates N-cadherin and Mel-CAM expression, as well as FAK phosphorylation. Notch1 activation also enhances tumor cell survival when cultured as three-dimensional spheroids. Furthermore, the oncogenic effect of Notch1 on primary melanoma cells was mediated by β -catenin, which was upregulated following Notch1 activation. Inhibiting β -catenin expression reversed Notch1-enhanced tumor growth and metastasis.

We conclude that the Notch-1 signaling is an active mechanism in the pathogenesis of melanoma. Our data therefore suggest a β -catenin-dependent, stage-specific role for Notch1 signaling in promoting the progression of primary melanoma. This is the first study to show the oncogenic role of Notch-1 in human melanoma malignum.

9 Irodalmi hivatkozások jegyzéke

1. Levi, F., et al., *Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960*. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 155-69.
2. Gaudi I., K.M., *A rosszindulatú daganatos halálozás változása 1975 és 2001 között Magyarországon*. Magyar Onkologia, 2002. **46**(4): p. 291-295.
3. Ferlay J, B.F., Pisani P, Parkin DM, *GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0*. IARC Cancer Base. Vol. No.5. 2001, Lyon: IARC Press.
4. Gaudi I., K.M., *Melanomas megbetegedések a Nemzeti Rakregiszter alapján*. Magyar Onkologia, 2003. **47**(3): p. 13-17.
5. Lens, M.B. and M. Dawes, *Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma*. Br J Dermatol, 2004. **150**(2): p. 179-85.
6. Kiss, J., et al., *Association of microvessel density with infiltrating cells in human cutaneous malignant melanoma*. Pathol Oncol Res, 2007. **13**(1): p. 21-31.
7. Liszkay, G., Pelez,G, Sinkovics,I, Péter,I, Orosz,Z, Fejős,Z, Horváth,B, Köves,I, Gilde,K, Kásler,M, *Clinical Significance of Sentinel Lymph Node Involvement in Malignant Melanoma*. Pathology Oncology Research, 2003. **9**(3): p. 184-187.
8. Ross, M.I., *New American Joint Commission on Cancer staging system for melanoma: prognostic impact and future directions*. Surg Oncol Clin N Am, 2006. **15**(2): p. 341-52.
9. Gilde, K., *[Milestones leading to new perspectives in melanoma therapy]*. Magy Onkol, 2003. **47**(1): p. 3-11.
10. Nestle, F.O., et al., *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 328-32.
11. Rosenberg, S.A., et al., *Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(24): p. 1894-900.
12. Rosenberg, S.A., et al., *Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 299-308.
13. Gonzalez-Cao, M., et al., *Preliminary results of the combination of bevacizumab and weekly Paclitaxel in advanced melanoma*. Oncology, 2008. **74**(1-2): p. 12-6.
14. Hofmann, U., et al., *Primary staging and follow-up in melanoma patients--monocenter evaluation of methods, costs and patient survival*. Br J Cancer, 2002. **87**(2): p. 151-7.
15. Dicker, T.J., et al., *A rational approach to melanoma follow-up in patients with primary cutaneous melanoma*. Scottish Melanoma Group. Br J Dermatol, 1999. **140**(2): p. 249-54.
16. Somlai, B., *[Clinical characteristics of melanoma metastasis]*. Magy Onkol, 2003. **47**(1): p. 85-8.
17. Martini, L., et al., *First recurrence analysis of 840 cutaneous melanomas: a proposal for a follow-up schedule*. Tumori, 1994. **80**(3): p. 188-97.
18. Rulyak, S.J., et al., *Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome*. Cancer, 2003. **98**(4): p. 798-804.
19. Clark, W.H., Jr., et al., *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(24): p. 1893-904.
20. Hsu, M.Y., F. Meier, and M. Herlyn, *Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 522-36.
21. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
22. Bogenrieder, T. and M. Herlyn, *Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6524-36.

23. Bogenrieder, T., Elder, D, Herlyn M, *Molecular and cellular biology*, in *Cutaneous melanoma*, C. Balch, Editor. 2003, Quality Medical Pub.: St.Louis, Mo. p. 713-740.
24. Luca, M.R. and M. Bar-Eli, *Molecular changes in human melanoma metastasis*. *Histol Histopathol*, 1998. **13**(4): p. 1225-31.
25. Bashyam, M.D., *Understanding cancer metastasis: an urgent need for using differential gene expression analysis*. *Cancer*, 2002. **94**(6): p. 1821-9.
26. Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn, *N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3819-25.
27. Hsu, M.Y., et al., *E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(5): p. 1515-25.
28. Kuphal, S., et al., *Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma*. *Oncogene*, 2004. **23**(52): p. 8509-19.
29. Shih, I.M., et al., *Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes*. *Am J Pathol*, 1994. **145**(4): p. 837-45.
30. Shih, I.M., et al., *Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen*. *Cancer Res*, 1994. **54**(9): p. 2514-20.
31. Luca, M., et al., *Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells*. *Melanoma Res*, 1993. **3**(1): p. 35-41.
32. Wu GJ, F.P., Wang AW, Wu MW, *Enforced expression of MCAM/MUC18 increases in vitro motility and invasiveness in vivo metastasis of two mouse melanoma K1735 sublines in a syngeneic mouse model*. *Molecular Cancer Research*, 2008. **6**(Nov 1.): p. 1666-1677.
33. Hsu, M.Y., et al., *Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(5): p. 1435-42.
34. Basson, M.D., *An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces*. *Cancer Res*, 2008. **68**(1): p. 2-4.
35. Abdel-Ghany, M., et al., *Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 34391-400.
36. Morgan, T.H., *The Origin of Nine Wing Mutations in Drosophila*. *Science*, 1911. **33**(848): p. 496-499.
37. Lai, E.C., *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. *Development*, 2004. **131**(5): p. 965-73.
38. Allenspach, E.J., et al., *Notch signaling in cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(5): p. 466-76.
39. Bolos, V., J. Grego-Bessa, and J.L. de la Pompa, *Notch signaling in development and cancer*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(3): p. 339-63.
40. Baron, M., *An overview of the Notch signalling pathway*. *Semin Cell Dev Biol*, 2003. **14**(2): p. 113-9.
41. Kao, H.Y., et al., *A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway*. *Genes Dev*, 1998. **12**(15): p. 2269-77.
42. Oswald, F., et al., *RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(23): p. 10379-90.
43. Wu, L., et al., *MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors*. *Nat Genet*, 2000. **26**(4): p. 484-9.
44. Niessen, K. and A. Karsan, *Notch signaling in cardiac development*. *Circ Res*, 2008. **102**(10): p. 1169-81.
45. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(9): p. 678-89.

46. Itoh, M., et al., *Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta*. Dev Cell, 2003. **4**(1): p. 67-82.
47. Pavlopoulos, E., et al., *neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis*. Dev Cell, 2001. **1**(6): p. 807-16.
48. Parks, A.L., et al., *Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway*. Development, 2000. **127**(7): p. 1373-85.
49. Hayward, P., et al., *Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity*. Development, 2005. **132**(8): p. 1819-30.
50. Hodkinson, P.S., et al., *Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras*. J Biol Chem, 2007. **282**(39): p. 28991-9001.
51. Karsan, A., *Notch and integrin affinity: a sticky situation*. Sci Signal, 2008. **1**(2): p. pe2.
52. Garg, V., et al., *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 270-4.
53. Alagille, D., et al., *Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental, and sexual development, and cardiac murmur*. J Pediatr, 1975. **86**(1): p. 63-71.
54. Anad, F., et al., *Alagille syndrome and deletion of 20p*. J Med Genet, 1990. **27**(12): p. 729-37.
55. Joutel, A., et al., *Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 707-10.
56. Sklar, P., et al., *Association analysis of NOTCH4 loci in schizophrenia using family and population-based controls*. Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 126-8.
57. Ellisen, L.W., et al., *TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. Cell, 1991. **66**(4): p. 649-61.
58. Parr, C., G. Watkins, and W.G. Jiang, *The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer*. Int J Mol Med, 2004. **14**(5): p. 779-86.
59. van Es, J.H. and H. Clevers, *Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease*. Trends Mol Med, 2005. **11**(11): p. 496-502.
60. Talora, C., et al., *Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation*. Genes Dev, 2002. **16**(17): p. 2252-63.
61. Miyamoto, Y., et al., *Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 565-76.
62. Purow, B.W., et al., *Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2353-63.
63. Chiaramonte, R., *Still puzzling Notch signaling in B-cell malignancies*. Leuk Res, 2006. **30**(11): p. 1331-2.
64. Qi, R., et al., *Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8323-9.
65. Kunnimalaiyaan, M., et al., *Overexpression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39819-30.
66. Dotto, G.P., *Notch tumor suppressor function*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5115-23.
67. Nicolas, M., et al., *Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 416-21.
68. Hayward, S.D., *Viral interactions with the Notch pathway*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(5): p. 387-96.
69. Weijzen, S., et al., *Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells*. Nat Med, 2002. **8**(9): p. 979-86.

70. Leong, K.G. and A. Karsan, *Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2223-33.
71. Ohishi, K., et al., *Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2847-54.
72. Orr, B., et al., *A role for Notch signalling in stromal survival and differentiation during prostate development*. Endocrinology, 2008.
73. Chen, Y., et al., *Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH-1 signaling in adenocarcinoma of the lung*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 7954-9.
74. Ozawa, M., M. Ringwald, and R. Kemler, *Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(11): p. 4246-50.
75. Peifer, M., L.M. Pai, and M. Casey, *Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase*. Dev Biol, 1994. **166**(2): p. 543-56.
76. Novak, A. and S. Dedhar, *Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(5-6): p. 523-37.
77. Morin, P.J., *beta-catenin signaling and cancer*. Bioessays, 1999. **21**(12): p. 1021-30.
78. Rimm, D.L., et al., *Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 325-9.
79. Park, W.S., et al., *Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4257-60.
80. Herlyn, M., et al., *Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression*. Cancer Res, 1985. **45**(11 Pt 2): p. 5670-6.
81. Smalley, K.S., et al., *Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(5): p. 1136-44.
82. Liu, Z.J., et al., *Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 14-25.
83. van de Loosdrecht, A.A., et al., *A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 311-20.
84. Yano, T., et al., *Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by somatostatin analog RC-160*. Oncology, 2000. **59 Suppl 1**: p. 45-9.
85. He, T.C., et al., *A simplified system for generating recombinant adenoviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2509-14.
86. Kobinger, G.P., et al., *Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 225-30.
87. Qin, X.F., et al., *Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 183-8.
88. Jeffries, S., D.J. Robbins, and A.J. Capobianco, *Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3927-41.
89. Cole, K.A., D.B. Krizman, and M.R. Emmert-Buck, *The genetics of cancer--a 3D model*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 38-41.
90. Nickoloff, B.J., B.A. Osborne, and L. Miele, *Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6598-608.

91. Hendrix, M.J., et al., *Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 665-8.
92. Hoek, K., et al., *Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5270-82.
93. Geling, A., et al., *A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish*. EMBO Rep, 2002. **3**(7): p. 688-94.
94. Dovey, H.F., et al., *Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain*. J Neurochem, 2001. **76**(1): p. 173-81.
95. Wu, L., et al., *Cloning and functional characterization of the murine mastermind-like 1 (Maml1) gene*. Gene, 2004. **328**: p. 153-65.
96. Suwanjune, S., W. Wongchana, and T. Palaga, *Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling*. Anticancer Drugs, 2008. **19**(5): p. 477-86.
97. Zang, S., et al., *A study on Notch signaling in human breast cancer*. Neoplasma, 2007. **54**(4): p. 304-10.
98. Schwartz, M.A., *Integrins, oncogenes, and anchorage independence*. J Cell Biol, 1997. **139**(3): p. 575-8.
99. Carney, D.N., A.F. Gazdar, and J.D. Minna, *Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung*. Cancer Res, 1980. **40**(6): p. 1820-3.
100. Sjolund, J., et al., *Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 217-28.
101. Rangarajan, A., et al., *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation*. EMBO J, 2001. **20**(13): p. 3427-36.
102. Thelu, J., P. Rossio, and B. Favier, *Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing*. BMC Dermatol, 2002. **2**: p. 7.
103. Morimura, T., et al., *Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36523-31.
104. Pui, J.C., et al., *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 299-308.
105. Uyttendaele, H., et al., *Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene*. Development, 1996. **122**(7): p. 2251-9.
106. Capobianco, A.J., et al., *Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6265-73.
107. Sriuranpong, V., et al., *Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3200-5.
108. Shou, J., et al., *Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7291-7.
109. Maillard, I. and W.S. Pear, *Notch and cancer: best to avoid the ups and downs*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 203-5.
110. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
111. Cockrell, A.S. and T. Kafri, *Gene delivery by lentivirus vectors*. Mol Biotechnol, 2007. **36**(3): p. 184-204.
112. Zhang, P., et al., *Critical role of notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(10): p. 2962-9.
113. Pinnix, C., Lee,TJ, Liu,Z-J, McDaid,R, Balint,K, Beverly,LJ, Brafford,PA, Nickoloff,BJ, Pear,W, Capobianco,AJ and Herlyn, M., *Active Notch1 protein confers a transformed phenotype to primary human melanocytes*. közlésre beküldve.

114. Fitzgerald, K., A. Harrington, and P. Leder, *Ras pathway signals are required for notch-mediated oncogenesis*. *Oncogene*, 2000. **19**(37): p. 4191-8.
115. Nam, Y., J.C. Aster, and S.C. Blacklow, *Notch signaling as a therapeutic target*. *Curr Opin Chem Biol*, 2002. **6**(4): p. 501-9.
116. Veeraraghavalu, K., et al., *Papillomavirus-mediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in JAGGED1 and manic fringe expression linked to notch activation*. *J Virol*, 2004. **78**(16): p. 8687-700.
117. Li, G., Satyamoorthy K., Herlyn M., *Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**: p. 62-70.
118. Hirohashi, S., *Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(2): p. 333-9.
119. Yap, A.S., W.M. Brieher, and B.M. Gumbiner, *Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. **13**: p. 119-46.
120. Kaibuchi, K., et al., *Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(5): p. 591-6.
121. Tran, N.L., et al., *Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(36): p. 32905-14.
122. Bedogni, B., et al., *Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development*. *J Clin Invest*, 2008.
123. Kang, D.E., et al., *Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 751-62.
124. Rubinfeld, B., et al., *Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines*. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1790-2.
125. Demunter, A., et al., *Loss of membranous expression of beta-catenin is associated with tumor progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations*. *Mod Pathol*, 2002. **15**(4): p. 454-61.
126. Satyamoorthy, K., et al., *Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways*. *Cancer Res*, 2001. **61**(19): p. 7318-24.
127. Alves-Guerra, M.C., C. Ronchini, and A.J. Capobianco, *Mastermind-like 1 Is a specific coactivator of beta-catenin transcription activation and is essential for colon carcinoma cell survival*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8690-8.
128. McElhinny, A.S., J.L. Li, and L. Wu, *Mastermind-like transcriptional co-activators: emerging roles in regulating cross talk among multiple signaling pathways*. *Oncogene*, 2008. **27**(38): p. 5138-47.
129. Mello, C.C. and D. Conte, Jr., *Revealing the world of RNA interference*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 338-42.
130. Lieberman, J., et al., *Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference*. *Trends Mol Med*, 2003. **9**(9): p. 397-403.
131. Delmas, V., et al., *Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development*. *Genes Dev*, 2007. **21**(22): p. 2923-35.
132. Rizzo, P., et al., *Rational targeting of Notch signaling in cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(38): p. 5124-31.
133. Song, X., et al., *Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the Drosophila ovary*. *Development*, 2007. **134**(6): p. 1071-80.

134. Ridgway, J., et al., *Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1083-7.
135. Nickoloff, B.J., et al., *Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma*. Cell Death Differ, 2002. **9**(8): p. 842-55.
136. Pitsouli, C. and C. Delidakis, *The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling*. Development, 2005. **132**(18): p. 4041-50.
137. Okajima, T. and K.D. Irvine, *Regulation of notch signaling by o-linked fucose*. Cell, 2002. **111**(6): p. 893-904.
138. Brou, C., et al., *A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 207-16.
139. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *Gamma-secretase: proteasome of the membrane?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 499-504.
140. Nam, Y., et al., *Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes*. Cell, 2006. **124**(5): p. 973-83.
141. Li, K., et al., *Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 8046-54.

10 Tárgyszavak:

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

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Juhász Istvánnak, a Bőrgyógyászati klinika habilitált egyetemi docensének a hosszantartó támogatásáért, és sok segítségért. Köszönöm a DEOEC Bőrgyógyászati Klinika igazgatójának, Hunyadi János Professzor úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a kísérletes munkát a Wistar Intézetben folytassam, valamint utódjának Remenyik Éva egyetemi tanárnak a PhD tanulmányaim befejezésének támogatását. Köszönettel tartozom orvoskollegáimnak, akiktől nagyon sokat tanultam.

Hálával tartozom dr. Meenhard Herlyn-nek, aki befogadott a laboratóriumába, és a lehetőséget adott a kutatási tervek megvalósításához. Őszintén köszönöm Zhao-Jun Liu segítségét, aki vérbeli „Notch-kutató”, és mindig útmutatással szolgált a Notch receptorokkal kapcsolatos információk rengetegében. Ezúton köszönöm Min Xiao-nak a segítségét a sejtenyésztés során, Keiran Smalley segítségét a szferoid modellel kapcsolatban. Köszönöm Akinobu Soma-nak a virális vektorok létrehozását, Chelsea Pinnix-nek a kvantitatív real-time PCR-t, Jamie Haydennek a fényképek elkészítését, Herbály Mihályné Erzsike asszisztensnek, a Bőrklinika szövettani laboratórium asszisztensének a szövettani metszetek elkészítését, valamint Rena Finko-nak a soft agar kísérlet (kolónianövekedési) titkainak felfedését.

Nagyon köszönöm családomnak a megértő támogatásukat, és azt hogy elviselték távollétemet. Köszönöm barátaimnak: Katrin Sproessernek, Kovács Enikőnek, Kari Lászlónak, Vödrös Dalmának, Halász Zsuzsának, hogy a kevésbé lendületes időszakokban is bizakodásra és mosolyra derítettek. Külön köszönöm dr. Szabó Imre önzetlen segítségét és támogatását tudományos karrierem kezdetén.

12 Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények listája

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 közlemények összegzett impakt faktora: 65.951

Független citációk száma: 103

Idézhető absztraktok:

Előadások:

K. Bálint, 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

K. Bálint, 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

Poszterek:

Bálint K, Juhász I, Hunyadi J.: In vivo carcinoma basocellularával szerzett tapasztalatok, Korányi Fórum, Budapest, 1999

Z.Krasznai, N.Szincsa, B.Rubovszky, K.Goda, G.Szabó, I.Juhász, L.Galuska, **K. Bálint**, B.Dezső, L.Trón and T. Márián: In vivo visualization of multidrug resistance by parallel administration of 18FDG and 99Mtc-MIBI, Congress of European Association of Nuclear Medicine, Párizs, 2000

J.Szabo, **K. Bálint**, A.Begany : Regional increase of incidence of primary cutaneous malignant melanoma in Hungary, 1989-1998, THE EDEN-IDEA Congress, Hollandia, 2001

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 , USA 2003

Z-J Liu, **K. Bálint**, A. Soma, H. Chen, M. Xiao, M. Herlyn: Notch1 signaling differentially regulates proliferation of melanoma and endothelial cells, 95th Congress of the American Association for Cancer Research, Orlando, FL, USA 2004

Z-J Liu, M Xiao, **K. Bálint**, A Soma, X Li, M Herlyn: Effect of Notch/MAML signaling cascade on melanoma cell growth is mediated through activation of MAPK and PI3K/Akt pathways, 2nd International Melanoma Research Congress, Phoenix, AZ, USA 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, USA 2004

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. Facciabene, R.J. Buckanovich, S. Kim, F. Benencia, D. Sassaroli, **K. Bálint**, D. Katsaros, A. O'Brian Jenkins, J.D. Lambris, P.A. Gimotty, G. Coukos: Endothelin (B) receptor mediates the endothelial barrier to T-cells homing to tumors, and its neutralization enables tumor immune therapy, 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, 2007

K. Bálint, R.J. Buckanovich, J.R. Conejo-Garcia, F. Benencia, D.Sassaroli, A. O'Brian-Jenkins, G. Danet Desnoyers, P.A. Gimotty and G. Coukos: Characterization of vascular leukocytes, Gordon conference on Angiogenesis & Microcirculation, Newport, RI, 2007

S.H. Kim, R. Buckanovich, **K. Bálint**, C.S. Chu, P. Gimotty and G.Coukos: Neuropilin-2 as biomarker for poor clinical outcome in epithelial ovarian cancer, 39th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, 2008, Tampa, FL

R.J. Buckanovich, **K. Bálint**, D. Sasaroli, F. Benencia, A. O'Brian-Jenkins, G. Danet-Desnoyers, P.A. Gimotty and G. Coukos: Human vascular leukocytes are vasculogenic precursor cells in ovarian cancer, 101st Congress of the American Association for Cancer Research, 2008, San Diego, CA

K. Bálint, A Facciabene, R Hammond, X Peng, PA Gimotty and G Coukos: Link between interleukin-22 and regulatory T-cells in the mechanism of immunoevasion in ovarian cancer, 2nd International Conference on Ovarian Cancer, Rhodos, Greece, 2008

13 Függelék (In extenso közlemények)