

A KUTATÁS EREDMÉNYEIT ÖSSZEFOGLALÓ SZAKMAI ZÁRÓBESZÁMOLÓ

A pályázat címe

**Oszteopontin: Szerepe jelátviteli útvonalakban és melanoma
progresszióban**

Title of the project

Osteopontin: Role in cellular signalling and melanoma progression

A pályázat megvalósításában meghatározó szerepet játszott

MTA-DE Népegészségügyi Kutatócsoport

Dr. Ádány Róza, Ecsedi Szilvia, Vízkeleti Laura, Kiss Tímea,

Koroknai Viktória, Szász I

DE ÁOK Bőrgyógyászati Klinika

Dr. Emri Gabriella

DE ÁOK Patológiai Intézet

Dr. Méhes Gábor

Külföldi Partner

Professor Zdenko Herceg's research group

**Section and Group Head, International Agency for Research on Cancer, Lyon,
France**

2020. február 05.

I. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

A malignus melanoma az egyik legagresszívabb humán daganat, mely különböző szerveket érintő fokozott metasztázis képzéséről ismert. Bár előfordulása ritkább más bőrdaganatokhoz képest, mégis a legtöbb halálozásért felelős típusnak tekinthető. Évente 230.000 új esetet regisztrálnak világszerte, amelyből 55.000 végződik halállal; azonban a kormegoszlásra standardizált előfordulása (esetek száma/100.000 fő) eltérő. Bár a fiatalabb korosztályt érintő melanomás esetek száma az elmúlt években csökkenni látszik, előfordulása globálisan még növekszik, Magyarországot is beleértve.

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

A malignus melanomát nagyfokú genomális heterogenitás jellemzi. Az eltérő jelátviteli útvonalak érintettsége és az ezek közötti kölcsönhatások komplexitása azt sugallja, hogy az egyedi genetikai és molekuláris eltérések önmagukban nem rendelkeznek döntő befolyással a betegség kialakulására és progressziójára. Azonban a különböző eltérések (genetikai, génexpressziós és epigenetikai) halmozódása, a tumor sejt és mikrokörnyezete közötti „párbeszéd” együttesen már képes eltérő klinikai-biológiai kimenetel kialakítására. Így a molekuláris tulajdonságok, eltérések feltérképezése segíthet a jelenleg létező klasszifikációs rendszerek (hisztológiai és molekuláris) pontosításában.

Összhangban az irodalmi adatokkal, génexpressziós vizsgálataink során (AffymetrixU133Plus2.0) primer melanomákban a megnövekedett expressziójú gének közül a legnagyobb mértékű változást (>20x) az osteopontin (OPN) génre figyeltük meg (*Rákosy és mtsai. PLoS One. 2013;8(1):e54958.*). Az osteopontin (OPN) egy olyan multifunkcionális molekula, mely legújabb irodalmi adatok alapján a melanoma progresszióban is fontos szerepet játszik (*Treskova I. Anticancer Res. 2018. 38(8):4907-4911*). Az OPN emelkedett plazma szintje a legújabb vizsgálatok szerint számos daganatnál szoros összefüggést mutat a metasztázisok jelenlétével, ezért ígéretes biomarkernek tartják (*Bruha R, Ann Hepatol. 2020 Jan 17. pii: S1665-2681(20)30001-6.*). Továbbá jelentős szerepe van a daganatos megbetegedéseknél alkalmazott gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulásában is (*Pang X, Pharmacol Res. 2019 Jun;144:235-244.*). Szerteágazó funkciói révén számos lehetőséget kínál specifikus immunterápia fejlesztéséhez. Összetett biológiai funkcióit nemcsak alternatív transzlációja és poszttranszlációs módosításai biztosítják, hanem alternative splicing is, mely során számos OPN variáns van jelen további módosításokhoz.. Alternatív splicing-gal keletkező izotípusoknak mind az előfordulása, mind a melanoma progresszióban betöltött szerepe ismeretlen.

II. A KUTATÁS CÉLJA

- OPN expresszió mintázatának meghatározása primer melanomákban és melanoma metasztázisokban, az expressziós mintázat összehasonlítása a betegek klinikai paramétereivel,
- OPN splice variánsok jelenlétének/mintázatának meghatározása/elemezése primer és metasztatikus melanomákban, primer tumor és metasztázis eredetű melanoma sejtvonalakban,
- siRNS transzfekciót követően a transzfektált sejtvonalakon proliferációs, inváziós és migrációs esszékkel az OPN melanoma progresszióban betöltött szerepének vizsgálata,

- milyen szerepet játszik a melanomák (minták: primer tumor és melanoma metasztázis eredetű sejtvonalak, melanoma modellrendszerek) progressziójában, a melanoma sejtek fokozott invazív tulajdonságában,
- az OPN szerepének meghatározása a BRAFV600E mutációt hordozó melanoma sejtekben kialakult gyógyszer-rezisztenciában,
- az integrin receptorok génexpressziós mintázatának meghatározása, összefüggés megállapítása az OPN splice variánsok és integrinek expressziója között,
- annak meghatározása, hogy az OPN melanomákban milyen jelátviteli útvonalakban vesz részt, milyen a celluláris lokalizációja,
- eredményeink közlése nemzetközi és hazai folyóiratokban, valamint eredményeink bemutatása hazai-és nemzetközi konferenciákon.

III. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ÉS STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

Genomikai és molekuláris biológiai módszerek

Vizsgálatainkhoz a genomika különböző módszereit (array CGH,, globális génexpressziós eltérések - Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-, és DNS metiláció kimutatására alkalmas microchipek) alkalmaztuk. Szöveti microarray „fabrikálása a DE Patológiai intézetével kollaborációban TMA Master (Carl Zeiss, Jena, Germany) alkalmazásával történt. Eredményeink statisztikai elemzésével vizsgáltuk, hogy a különböző stádiumú és típusú szövetekre jellemző genetikai eltérések és a génexpresszió mintázata milyen összefüggésben áll a humán melanomák klinikopathológiai paramétereivel.

Array CGH eredmények statisztikai elemzése

Az eredmények kiértékelését SPSS Statistics (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) és R-2.15.0 program csomagok segítségével végeztük. Statisztikai elemzések: Az UCSC genome browser weboldal (<http://genome.ucsc.edu/>) segítségével az array CGH során használt BAC klónokat a humán genomra térképeztük. Az X és Y kromoszómán lokalizálódó oligonucleotid próbákat és az ismert genom variánsokat (Database of Genomic Variants: <http://projects.tcag.ca/variation/>) kizártuk a további elemzésből. A log₂ transzformált adatokat a CGH-Explorer software 3.2 segítségével értékeltük ki. Szignifikáns eltérésnek a többszörös összehasonlítási korrekciót (FDR, false discovery rate) követő $P \leq 0,01$ értéket tekintettük. Határértékként egy, az irodalomból ismert és gyakran használt értéket alkalmaztunk a nagymértékű amplifikációt ($>0,55$ log₂ rate), illetve a homozigóta deléciót ($<-0,8$ log₂ rate) mutató régiók azonosítására. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel, a varianciák egyenlőségét pedig Leven teszttel határoztuk meg. Mivel adataink nem normál eloszlást mutattak, ezért nem parametrikus teszteket alkalmaztunk. A modell magában foglalta az ismert melanoma prognosztikai faktorokat is, mint az ulceráció és az áttétképzés.

DNS metilációs elemzés

A metilációs vizsgálatokhoz biszulfít konvertált (EZ DNA Methylation kit; Zymo Research, Irvine, CA, USA) DNS mintákat használtunk. A módosítás minőségét PCR (HotStarTaq Master Mix kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) technikával ellenőriztük módosított és eredeti GAPDH primerek használatával alkalmazásával. A DNS- metilom profil meghatározásáta Illumina Infinium II Human Methylation 450K (HM450K) BeadChip assay-vel (Illumina, San Diego, CA, USA) végeztük.

Az adatok feldolgozása különböző Bioconductor alprogramok segítségével és az R v.3.2.2 használatával történt, mely során a metilációs beta értékeket logaritmikusan transzformálva megkaptuk az M értékeket, és ezekkel

végeztük a további parametrikus statisztikai elemzéseket. A DNS metilációs változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha az FDR korrigált p értékek 0,05 alatt voltak.

Gén expressziós és DNS metilációs eredmények korrelációja

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

The Cancer Genome Atlas (TCGA)

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

TaqMan assay

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

Jelátviteli útvonalakhoz rendelhető genetikai eltérések elemzése

A jelátviteli útvonalakhoz rendelhető genetikai eltérések elemzése során a különböző útvonalak adatait a Signalink adatbázisból (<http://signalink.org/>) töltöttük le, majd ezeknek a géneknek a kópiaszám eltéréseit a legközelebbi BAC klón (<2MB) segítségével becsültük meg. Egy jelátviteli útvonalban, illetve útvonalak közötti kapcsolatot biztosító jelátviteli interakciót akkor tekintettünk sérültnek, ha legalább az interakcióban résztvevő egyik fehérjét kódoló gén régiójában amplifikációt vagy deléciót azonosítottunk. Ezt követően átlagoltuk a különböző melanoma alcsoportokban a sérültnek definiált jelátviteli interakciók gyakoriságát, az egyes útvonalakban és különböző útvonalak között is.

Klaszter analízis

A cluster 3.0 programmal végeztünk hierarchikus klaszter analízist majd a TreeView java programot használtuk a klaszterek vizuális megjelenítéséhez. Az analízis során Pearson korrelációt és centroid vagy súlypont módszert alkalmaztunk.

Inváziós assay

Az inváziós képesség meghatározásához BD Biocoat Matrigel inváziós kamrákat használtunk (pórus méret: 8 μ m; BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA). A felső karma 500 μ l sejtuszpenziót tartalmazott szérumentes tápfolyadékban, (5×10^4 sejt/kamra). Az alsó kamrában 10% szérumot tartalmazó tápfolyadékot használtunk kemoattraktánsként. 24 óra inkubáció után az alsó kamrába átjutó sejteket metanollal fixáltuk és hematoxylin-eosinnal festettük. Az invazív sejteket fénymikroszkóp alatt 200x nagyításon 7 különböző látótérben számoltuk le és átlagoltuk. A BD Biocoat Matrigel inváziós karma alsó kamrájába átjutó sejteket 0.5% trypsin/0.2% EDTA oldattal (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) kezeltük, hogy a sejteket visszanyerjük a membránról. Az így szelektált sejteket tovább tenyésztettük DNS és RNS izolálás céljából.

Valós idejű kvantitatív PCR

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

Sejtproliferációs assay

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

Statisztikai elemzések

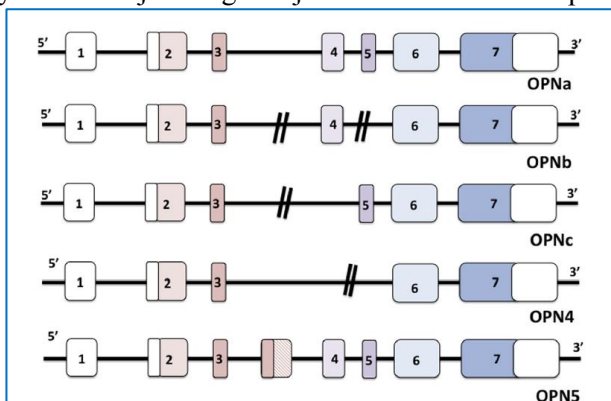
SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftvert használtuk a további statisztikai elemzéseinkhez. Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk az adatok normál eloszlásának meghatározásához. Pearson's korrelációval elemeztük az aCGH és qPCR adatok közötti összefüggést. Mann-Whitney-Wilcoxon tesztet használtunk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

IV. A PÁLYÁZATI TÁMOGATÁSSAL ELÉRT EREDMÉNYEK**IV.1. OPN expresszió mintázatának meghatározása primer melanomákban és melanoma metasztázisokban, az expressziós mintázat összehasonlítása a betegek klinikai paramétereivel**

Kísérleteink során primer melanomák (n=93) fehérje expressziójának mértékét szöveti multiblokk rendszerben vizsgáltuk. Az oszteopontin mRNS szintjét 28 primer melanoma mintában határoztuk meg, valós idejű qRT-PCR-rel. Összesen 14 mintát mindkét módszerrel analizáltunk. Az eredmények statisztikai kiértékeléséhez SPSS szoftvert használtunk, az OPN expresszió és klinikai adatok közötti összefüggéseket, Fisher's exact és Mann-Whitney-Wilcoxon tesztekkel elemeztük. Az OPN fehérje kifejeződését a primer melanomák 87%-ban figyeltük meg. Eredményeink szerint a fehérje expresszió mértéke szignifikánsan nagyobb a vastagabb (≥ 4 mm) és metasztázist képző daganatokban. Megállapítottuk, hogy a rosszabb prognózissal jellemezhető mintákban jelentősen magasabb az OPN expressziója. Az adatokat részletesen elemezve statisztikailag szignifikáns összefüggést állapítottunk meg a kontroll naevus mintához viszonyított relatív oszteopontin expresszió és a daganatok szélének kifeléelyesedése, a Breslow-féle vastagsága, valamint stádiuma között. Az eredményeket összefoglalva demonstráltuk, hogy a primer melanomákban a fokozott OPN expresszió rosszabb prognózissal társul (*Kiss T et al. Tumor Biol. (2015) 36:7841–7847*). Az OPN emelkedett szintje, a legújabb vizsgálatok szerint, jelentős szerepet játszhat a daganat kialakulásában és progressziójában (*Wei et al.: Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. J Cancer. 2017 Jul 15;8(12):2173-2183*).

IV./2. OPN splice variánsok jelenlétének/mintázatának meghatározása/elemezése primer és metasztatikus melanomákban, primer tumor és metasztázis eredetű melanoma sejtvonalakban

Az OPN funkcióját tekintve rendkívül változatos molekula (glükofoszfoprotein), mely az integrin útvonalon keresztül befolyásolja a tumorsejtek és az extracelluláris mátrix fehérjéi közötti kapcsolatot, ezáltal hatást gyakorol a sejtek migrációjára és a metasztázis képzésre.

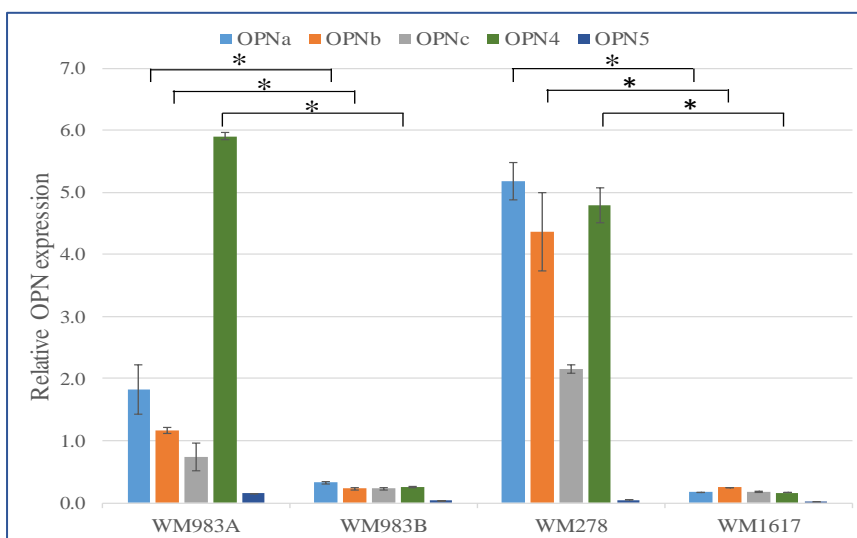


1. Ábra Az OPN génstruktúrája, splice variánsok
Bastos et al. / Cancer Letters 408 (2017) 138e143

Biológiai funkciói közül melanomában az alternatív splicing eredményeként keletkező splice variánsok szerepe ismeretlen (**1. Ábra**: OPNa, OPNb, OPNc, OPN4 és OPN5). Modell kísérleteink során primer melanomából és melanoma metasztázisokból származó sejtvonalakban az OPN mRNS expresszióját tanulmányozva megállapítottuk, hogy a sejtvonalak többségében az OPN mRNS expresszió emelkedett,

melyet a sejtvonalakban fehérje szinten is kimutattuk. Vizsgáltuk továbbá az OPN splice variánsok génexpressziós mintázatát a különböző klinikai paraméterekkel jellemzett primer melanomákból és melanoma metasztázisokból létrehozott sejtvonalakon (összesen 20 sejtvonal) és különböző altípusú melanoma szövetmintákban (primer tumor: n=36; melanoma metasztázis: n=12). A génexpresszió vizsgálatához belső kontroll génként GAPDH-t, kontrollként melanocitákból származó mRNS-t használtunk. Általánosságban megfigyeltük, hogy a metasztázis eredetű sejtvonalakban (n=8) az OPNa (ami a teljes OPN molekula) megnövekedett expressziót mutat, az eltérés szignifikánsnak bizonyult a primer melanoma eredetű sejtvonalakhoz (n=12) képest.

Elemezve az azonos betegből származó sejtvonalak OPN expressziós szintjét, megfigyeltük, hogy két mintapárban (WM983A és WM983B; WM278 és WM1617) az OPNa, OPNb és OPN4 expressziója a primerekben emelkedett, ugyanakkor a metasztázisokban szignifikánsan csökkent (3. Ábra).. Ennek magyarázata további vizsgálatokat igényel, elképzelhető, hogy a heterogén összetételű daganat sejtekkel függ össze.

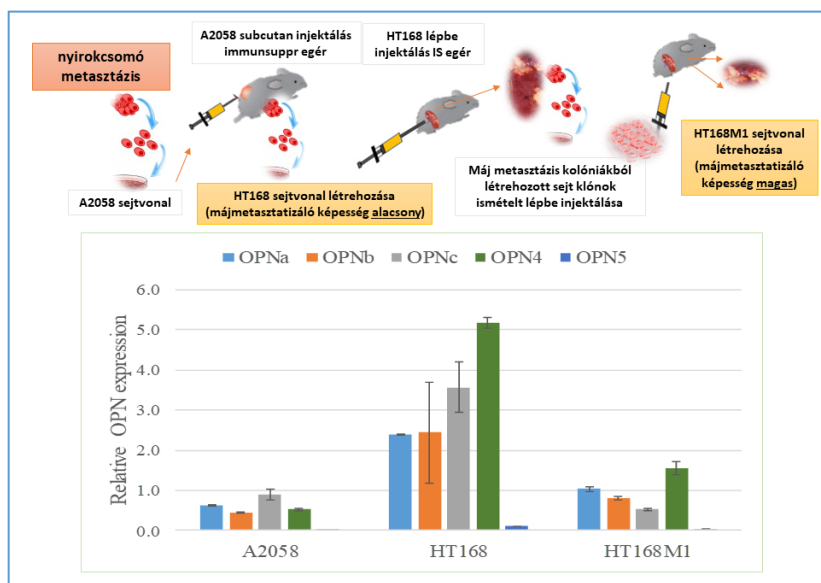


2. Ábra. Az OPN öt splice variánsának (OPNa, OPNb, OPNc, OPN4 és OPN5) relatív génexpressziója az azonos betegekből származó primer és metasztázis eredetű sejtvonal párokban (WM983A-WM983B és WM278-WM1617)

Az OPN izoformák expressziója a két melanoma sejtvonalpárban csak a metasztázisokban mutatott azonos mintázatot, mindkét metasztázisban mind az 5 variáns expressziója szignifikánsan alacsony volt a primer tumorból származó sejtekhez

viszonyítva ($p < 0,05$). Mindkét primer sejtvonalban az OPN4 expressziója magas volt, ami a WM278 agresszív metasztatizáló sejtvonalban OPNa és OPNb emelkedett expresszióval is társult.

Metasztázis modell rendszerben OPN splice variánsok expressziójának vizsgálata.

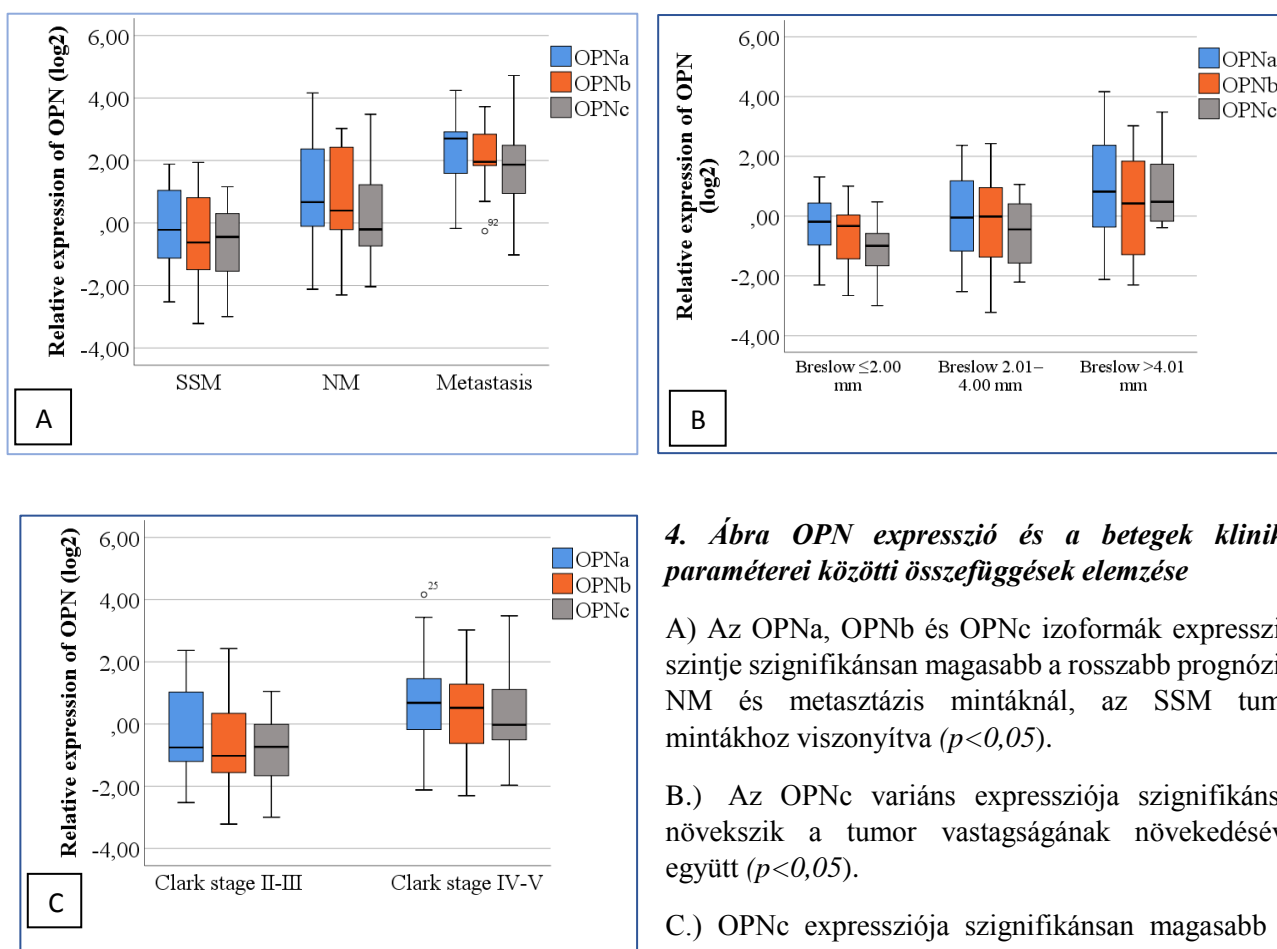


3. Ábra OPN izoformák relatív expressziója melanoma metasztázis modellrendszer sejtvonalaiban

A2058 agyi metasztázis eredetű sejtvonalból *in vivo* szekvenciálisan szelektált két sejtvonalban (HT168 és HT168M1) tanulmányoztuk az OPN splice variánsok expresszióját. A HT168M1, magas májattét képző hajlammal jellemzett sejtvonalban az eredetivel azonos, kismértékű OPN variáns expressziókat detektáltunk, ugyanakkor az immunosuppresszált egérből az A2058 sejtek subkután injektálását követően létrehozott HT168 sejtvonal, melyet alacsony

májáttét képző hajlammal jellemeztek, négy OPN variáns (OPNa, OPNb, OPNc és OPN4) emelkedett expresszióját tapasztaltuk (legnagyobb mértékű az OPN4 variáns expressziója volt). Az OPN5 variáns expressziója mindhárom sejtvonalban alacsony volt. A HT168 sejtekből létrehozott magas májmetasztázáló hajlammal jellemezhető HT168M1 sejtvonalban az OPN splice variánsok expressziója lecsökkent. Ez arra utalhat, hogy a májáttét képzés ebben a modell rendszerben független az OPN és az izoformáinak expressziójától.

Vizsgálatainkat klinikai mintákra is kiterjesztettük. A sejtvonalak eredeti szöveteinek klinikai paramétereit és az OPNa, OPNb és OPNc splice variánsok expresszióját összehasonlítva megállapítottuk, hogy az SSM (superficial spreading melanoma) altípusból származó sejtvonalakban a génexpresszió mértéke lényegesen alacsonyabb, mint a rosszabb prognózissal jellemezhető NM (nodular melanoma) altípusban. Ezt a különbséget az altípusok között szöveti mintákon is sikerült megfigyelni (4. Ábra).



4. Ábra OPN expresszió és a betegek klinikai paramétereinek közötti összefüggések elemzése

A) Az OPNa, OPNb és OPNc izoformák expressziós szintje szignifikánsan magasabb a rosszabb prognózisú NM és metasztázis mintáknál, az SSM tumor mintákhoz viszonyítva ($p < 0,05$).

B.) Az OPNc variáns expressziója szignifikánsan növekszik a tumor vastagságának növekedésével együtt ($p < 0,05$).

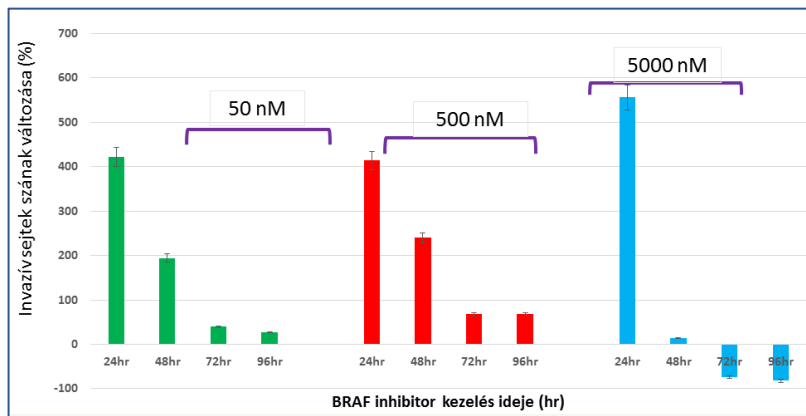
C.) OPNc expressziója szignifikánsan magasabb az előrehaladottabb Clark stádiumokban (IV., V.), mint a

II., III. stádiumban ($p < 0,05$). A 4. Ábra adatai alapján feltételezzük, hogy az OPNa, OPNb és OPNc variánsok szerepet játszanak a melanoma progresszióban. Ugyanakkor az OPN4 és OPN5 variánsok expressziójára vonatkozóan nem találtunk szignifikáns összefüggést a klinikai paraméterekkel.

Irodalmi adatok szerint az OPN és splice variánsainak szerepe van a gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulásában, modulálásában is (*Gimba ERP.: Pharmacol Res. 2019. 144:235-244.*). Az OPN indukálta foszforiláció és a MAPK jelátviteli folyamat aktiválása meghatározó emlő és prosztata daganatokban (*Dhillon et al Oncogene, 2007. 26(22):3279-3290*). Az előrehaladott, BRAF mutációt hordozó daganatok sikerrel kezelhetők a BRAF-fehérje működését gátló inhibitorral (vemurafenib), mely olyan target specifikus gyógyszer, ami ténylegesen meghosszabbítja a betegek túlélését. A sikeres kezelést azonban beárnyékolja a viszonylag gyorsan kialakuló rezisztencia, melynek molekuláris háttere kevésbé ismert. BRAFV600E mutációt hordozó

sejtvonalakra vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az OPN variánsok expressziója és a melanomák BRAF inhibitorokkal szemben tapasztalt gyógyszer-rezisztencia között.

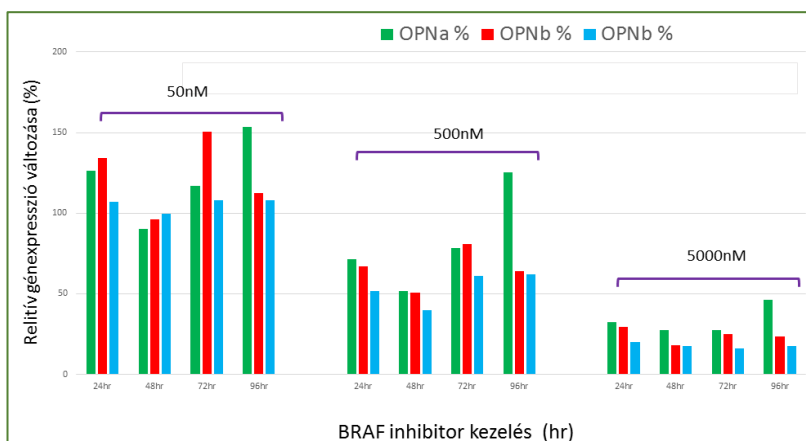
Kísérleteink során BRAF inhibitor rezisztens primer és metasztázis eredetű melanoma sejtvonalakat hoztunk létre és összehasonlítottuk az eredeti és rezisztens sejtvonalak jellegzetességeit (proliferációs hajlam, invazív képesség).



5. Ábra BRAF inhibitor hatása a WM278 melanoma sejtek invazív képességére a kezelés különböző időpontjaiban

Továbbá meghatároztuk az OPN izotípusok génexpresszióját a BRAF inhibitor koncentrációjának függvényében a kezelés különböző időpontjaiban. Megállapítottuk, hogy a sejtek invazív képessége a BRAF inhibitor (vemurafenib analóg: PLX720)

kezelést követően 24 órával jelentősen megemelkedik a kontrollhoz viszonyítva, majd az invazív sejtek száma jelentősen csökken (6. Ábra). 5 μ M-nál nő meg a legnagyobb mértékben a kezelést követő 24 hr múlva, ezután viszont nagyon jelentős a csökkenés, aminek elsődleges oka a sejtek nekrozisa.



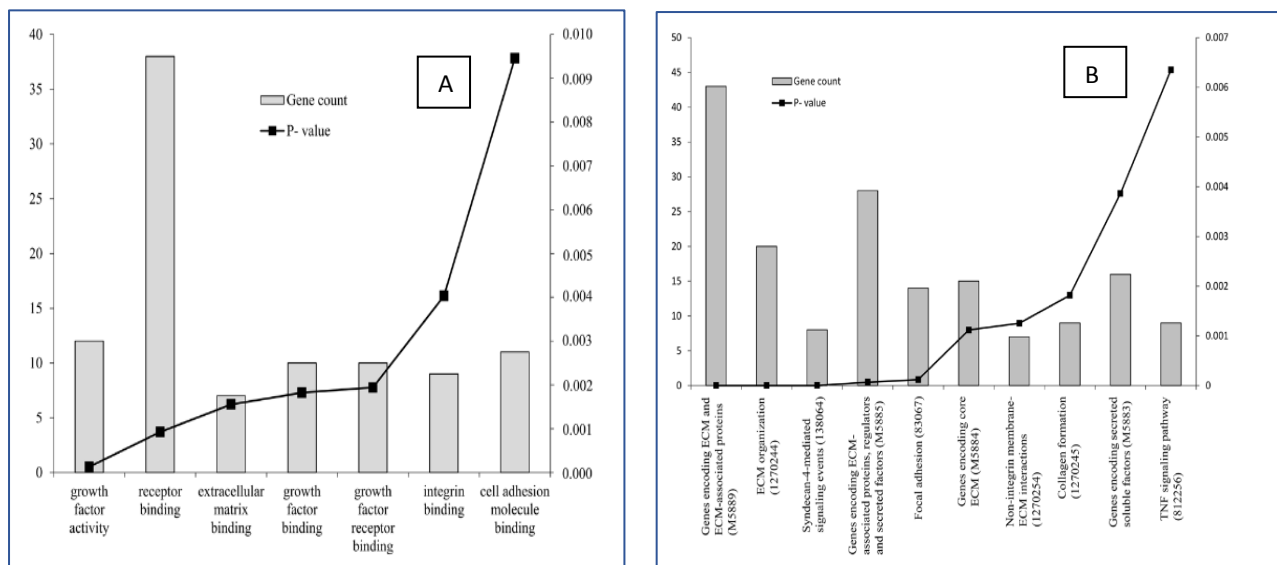
6. Ábra WM278 melanoma sejtekben az OPN "splice variánsok" relatív génexpressziójának változása a kontrollhoz viszonyítva.

Az OPN splice variánsok relatív expressziója a BRAF inhibitor kezelés során 0-96 hr között 50nM -nál a legnagyobb, 500nM-nál 96 óra után az OPNa expressziója jelentősen megnő, 5 μ M-nál a tendencia hasonló, de az expresszió mértéke kisebb, mint az előző két koncentrációnál volt.

OPN expresszió változása melanoma sejtek BRAF inhibitor kezelést követően, a rezisztencia molekuláris háttere, BRAF rezisztenciával összefüggő jelviteli folyamatok analízise génexpressziós mintázat alapján

Vizsgálatainkhoz ugyanabból a betegből származó BRAFV600E mutációt hordozó primer tumor és metasztázis eredetű melanoma sejtvonalak és a mutáns BRAF fehérje működését gátló inhibitor (vemurafenib analóg PLX4720) kezelés során létrehozott, a kezelésre rezisztens sejtvonal modellrendszerek genomikai és proteomikai eltéréseit hasonlítottuk össze. Fehérje expressziós vizsgálatainkhoz Proteome Profiler Human XL Oncology Array-t alkalmaztunk, segítségével 84 daganatspecifikus fehérje expressziós mintázatát hasonlítottuk össze. Eredményeink szerint valamennyi rezisztens sejtvonalban egységesen megnőtt hat fehérje (ANGPTL4, EGFR, Endoglin, FGF2, Serpin E1, VCAM-1) és csökkent két fehérje (survivin és OPN) expressziója. Míg a fehérjék egy részénél az expresszió változását már összefüggésbe hozták a BRAF inhibitorokkal szemben kialakult rezisztenciával, addig a VCAM-1 és OPN kapcsolatát elsőként mi írtuk le (*Szász I, et al. Melanoma Research 29(4):390-400. 2019*).

Génexpressziós vizsgálataink során a BRAF inhibitor rezisztens sejtek génexpressziós profilját összehasonlítottuk az inhibitor érzékeny sejtvonalakéval, és ezt követően útvonal analízist végeztünk el (7. Ábra).

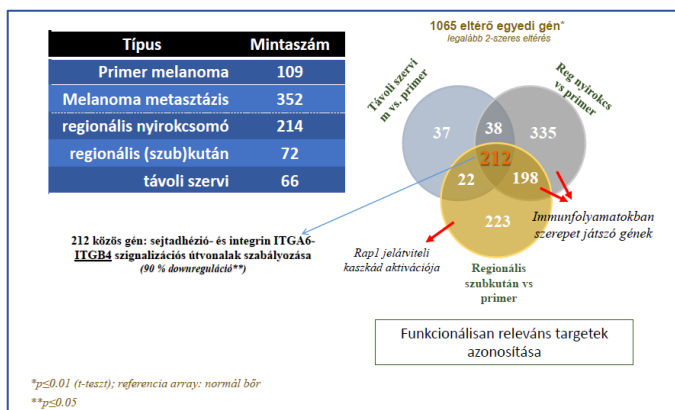


7. Ábra Molekuláris funkció A.) és jelátviteli útvonal B.) analízis rezisztens sejtekben szignifikánsan megnövekedett expressziót mutató génekre (n=204)

Az overexpresszált gének molekuláris funkció szerinti analízise alapján a gének növekedési faktorok, növekedési faktor receptorok, extracelluláris mátrix komponensei (ECM), integrinek és sejt adhéziós molekulák csoportjaiba tartoznak; továbbá 151 biológiai folyamatban fontos szerepet játszanak a Gén Ontológiai csoportosítás alapján, mint például: angiogenezis, vér erek képződése, sejt migráció és sebgyógyulás. A szignifikánsan megváltozott útvonalak legkevesebb öt gént tartalmaztak a különböző gén csoportokból, beleértve a következőket: az extracelluláris mátrixot (ECM) és ECM-hez köthető fehérjék kódolásáért felelős gének; az ECM szerveződésében szerepet játszó gének; ECM-hez köthető fehérjék kódolásáért felelős gének, beleértve az ECM-hez kapcsolt fehérjéket, ECM szabályozókat és szekretált faktorokat; fokális adhézióért felelős géneket; ECM magját kódoló gének beleértve a ECM glikoproteinjeit, collagénjeit, proteoglikánjait; géneket melyek szerepet játszanak a non-integrin membrán ECM kapcsolódásért; géneket melyek szekretált szolubilis faktorokat kódolnak és géneket melyeknek a TNF szignalizációs útvonalban van szerepük. Array CGH eredményeink alapján két olyan génelterést (8q24: SAMD12 és EXT1), azonosítottunk, melyek a rezisztencia kialakulását követően valamennyi sejtvonalban létrejött. Ezeknek a géneknek az eltéréseit melanomákban eddig még nem írták le, ugyanakkor megfigyelték a SAMD gén túlzott expresszióját emlődaganat őssejtekben, és az EXT1 gén proliferációt fokozó emelkedett expresszióját írták le több tumor típus esetében. Feltételezzük, hogy a SAMD12 és az EXT1 gének fokozott expressziója a melanoma esetében is a gyógyszerrezisztencia kialakulásával állhat összefüggésben. Ezeknek a fehérjéknek a megváltozott expressziója egyértelműen arra utal, hogy a rezisztencia kialakulása több jelátviteli útvonalat érint, (Szász I, et al. *Melanoma Research* 29(4):390-400. 2019).

IV./3 Az integrin receptorok génextpressziós mintázatának meghatározása primer és metasztatikus melanoma tumorokban, összefüggés megállapítása az OPN splice variánsok és integrinek expressziója között, OPN szerepe a melanoma progresszióban

Melanomák szervspecifikus áttétképzésében szerepet játszó genomikai eltérések felderítéséhez saját és a TCGA adatbázis génextpressziós adatait integráltuk. Megállapítottuk, hogy a metasztázis képzésben észlelt expressziós változások főleg a sejt-sejt, sejt-mátrix kölcsönhatásban, sejt migrációban és invázióban szerepet játszó géneket, továbbá integrinek kódoló géneket (ITGA és ITGB) érintik (Vízkeleti et al. *Melanoma Res.* 27(3):180-188. (2017)). Génextpressziós adataink alapján megállapítottuk, hogy az 1065 eltérő expressziót mutató egyedi gének 3 csoportba sorolódnak (11. ábra), analízisünk szerint a 212 közös gén több mint 90%-a „downregulált” volt és a sejtadhézió-, valamint ITGA6-B4 jelátviteli útvonalak szabályozásában játszottak szerepet.

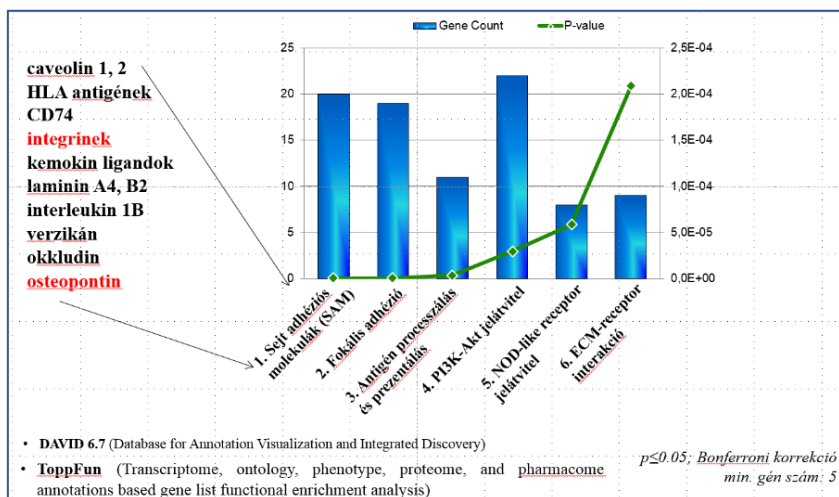


8. Ábra Melanoma szöveti minták génexpressziós analízise TCGA RNAseq v2.0 eredmények alapján

A fő különbség a távoli és regionális áttétek között a különböző immunszabályozó útvonalak génjeinek túlzott expressziója volt. Emellett a regionális (szub)kután áttétek jellegzetességének bizonyult a Rap1 jelátviteli kaszkád aktiválódása, mely feltehetőleg a Ras-mediálta jelátvitel szabályozása révén számos sejtfunkció szabályozásában játszik szerepet.

A független primer és áttéti mintacsoportok legmarkánsabb eltérése az ITGB4 mRNS szint csökkenése volt mindhárom áttét típusban a primer mintákhoz viszonyítva. Emellett megfigyelhettük, hogy az ITGA3 szintje szignifikánsan csökkent is, de kevesebb, mint 2x-es „fold-change” értékkel.

Komplex molekuláris hálózatok azonosítására útvonal analízist végeztünk a TCGA adatbázisban fellelhető több mint 500 mintát magában foglaló RNAseq adatok elemzésével 413 áttétekben downregulált géneket online elérhető szoftver segítségével. Az analízis szerint a csökkent mRNS szinttel rendelkező gének 6 molekuláris útvonalban dúsultak be, melyek leginkább a sejt-sejt, sejt-mátrix kapcsolatok és immunfolyamatok szabályozásában játszanak szerepet (12. Ábra).



9. Ábra A metasztázis mintákban csökkent expresszióval jellemezhető gének útvonal analízise

Az csökkent expressziójú gének listája számos integrin molekula és az osteopontin eltérését is magában foglalta. Az azonosított molekuláris útvonalak nagy jelentőséggel bírnak a különböző inváziós stratégiák közötti átkapcsolásban, így az áttétképzésben is.

alkalmaztunk. A tüdőbe metasztatizáló melanomák modellrendszerében a primer tumorhoz képest az invazív klónokban az ITGA4, -A6, -A9 gének expressziója jelentősen megnőtt, majd a metasztatikus sejtekben a gének expressziója ismét lecsökkent. A nyirokcsomóba metasztatizáló rendszerben az invazív tulajdonság az ITGA4 és az ITGB5 gének expresszió csökkenésével társult. Az ITGB5 fokozott expressziója a mezenchimális invázióban, az ITGA4 a tumor-asszociált érképződésben játszik fontos szerepet. Összefoglalva eredményeinket, a metasztázisképzéssel összefüggésbe hozható funkcionálisan releváns gén klasztereket azonosítottunk. Eredményeink további bizonyítékokat szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy az integrin expressziós mintázata fontos szerepet játszik a szervspecifikus metasztázisok kialakulásában.

Az integrin receptorok vizsgálatára kétféle sejtvonali modellrendszert

Tekintettel arra, hogy az OPN a daganat progresszióhoz különböző integrin és a CD44 receptorokon keresztül járul hozzá, tanulmányoztuk az integrin receptorok és osteopontin variánsok (OPNa, OPNb, OPNc, OPN4 és OPN5) expressziója közötti kapcsolatot. Korrelációs elemzéseink alapján megállapítottuk, hogy az OPN4 expresszió pozitív korrelációt mutat az ITGA2 kivételével valamennyi tanulmányozott integrin receptor expressziójával, az OPNa, OPNb és OPNc expresszió pedig negatívan korrelál az ITGA2 expresszióval (**I. Táblázat**). Annak kiderítése, hogy melanomákban az egyes OPN splice variánsok milyen integrineken keresztül vesznek részt jelátviteli folyamatokban további vizsgálatokat igényel.

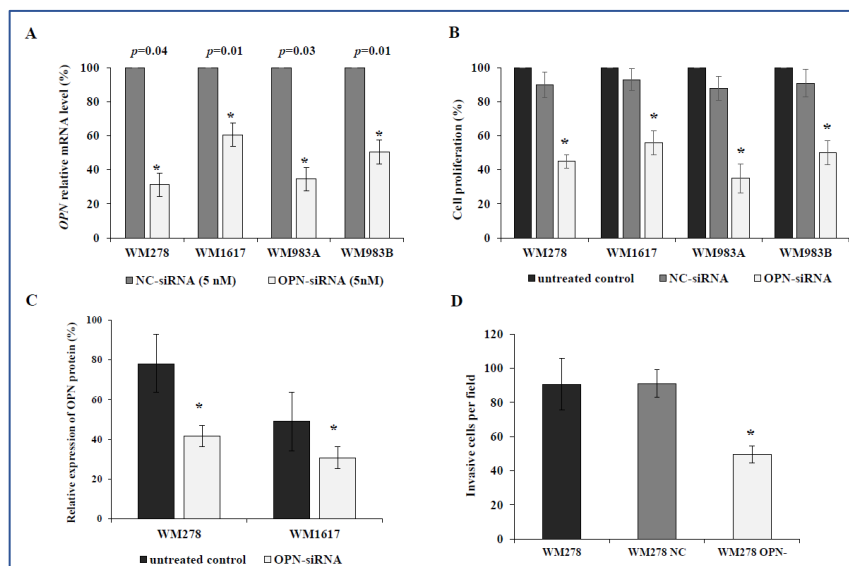
1. Táblázat. Az oszteoponton variánsok és integrin receptorok expressziójának korrelációja

		ITGB3	ITGA5	ITGA2	ITGA9	ITGAV	ITGB1	ITGA3	ITGA6
OPNa	Correlation Coefficient	-0.88	-0.136	-0.480**	-0.116	-0.182	-0.008	-0.108	-0.213
	Sig. (2-tailed)	.594	.410	.002	.481	.267	.960	.513	.192
	N	39	39	39	39	39	39	39	39
OPNb	Correlation Coefficient	-0.052	-0.121	-0.420**	-0.055	-0.127	.059	-0.084	-0.153
	Sig. (2-tailed)	.754	.462	.008	.741	.440	.721	.610	.353
	N	39	39	39	39	39	39	39	39
OPNc	Correlation Coefficient	-0.134	-0.264	-0.542**	-0.272	-0.308	-0.201	-0.272	-0.398*
	Sig. (2-tailed)	.416	.104	.000	.094	.056	.221	.094	.012
	N	39	39	39	39	39	39	39	39
OPN4	Correlation Coefficient	.607**	.531**	.283	.532**	.520**	.591**	.581**	.500**
	Sig. (2-tailed)	.000	.001	.080	.000	.001	.000	.000	.001
	N	39	39	39	39	39	39	39	39
OPN5	Correlation Coefficient	.279	.285	.452**	.248	.503**	.349*	.365*	.405*
	Sig. (2-tailed)	.086	.079	.004	.129	.001	.030	.022	.010
	N	39	39	39	39	39	39	39	39

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).
 * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

IV./4 OPN specifikus siRNS hatása OPN expresszióra, sejtproliferációra és a sejtek invazív képességére

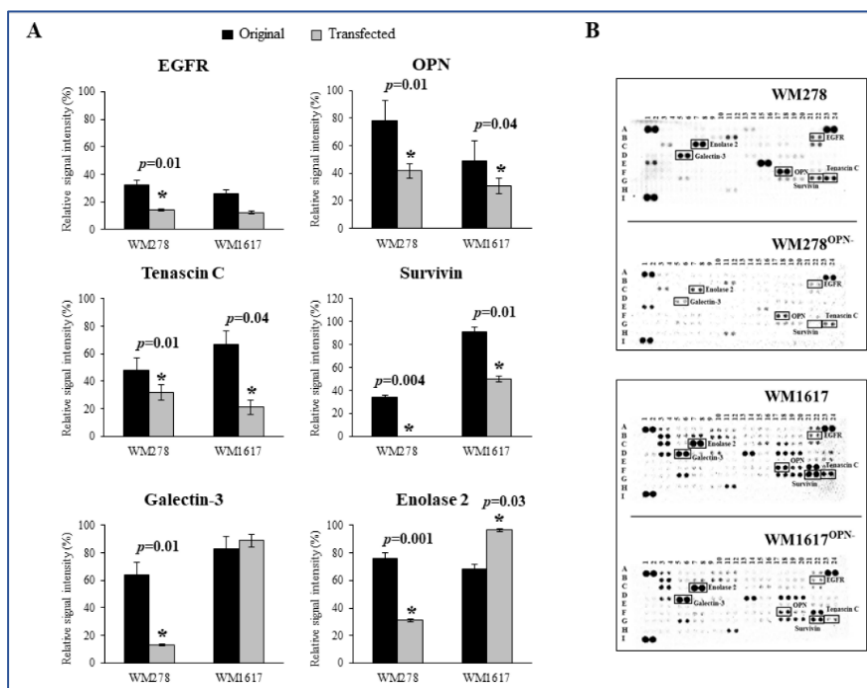
Célunk volt az OPN-t kifejező sejtvonalakban az OPN gén csendesítését (siRNS; RNS interferencia) követően a sejtek proliferációjának, az OPN expresszió szintjének és az OPN csendesítést követően daganatspecifikus fehérjék expressziós mintázatának meghatározása is. Az OPN-si-RNS a gyártó cég által validált specifikus si-RNS volt, kontrollként nem specifikus siRNS-t alkalmaztunk.



Megállapítottuk, hogy az OPN-siRNS transzfektált sejtvonalakban az OPN gén expressziója szignifikánsan csökkent (9A. Ábra). A géncsendesítését követően a sejtproliferáció a kontrollhoz és a negatív kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent (9B. Ábra), az mRNA expresszióhoz hasonlóan az OPN fehérje expresszió csökkenését is megfigyeltük (9C. Ábra). Az siOPN RNS transzfektált sejtek invazív képessége szignifikánsan csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva (9D. Ábra) ($p < 0,05$).

Irodalmi adatok szerint az OPN jelentős szerepet játszik az Nf- κ B jelátviteli útvonal szabályozásában - befolyásolva ezzel a daganatsejtek migrációját és metasztázis képzését - vizsgáltuk az Nf- κ B p65 fehérje kifejeződését az OPN mRNS-t különböző mértékben expresszáló sejtvonalakban. Megfigyeltük, hogy magas OPN expresszió mellett az Nf- κ B p65 fehérje expresszió jelentős nemcsak a citoplazmában, hanem az agresszív metasztázis képzéssel jellemzett sejtvonalakban a sejtmagban is, ami utalhat az Nf- κ B jelátviteli útvonal aktivációjára magas OPN expressziónál.

Meghatároztuk továbbá az OPN siRNS csendesített sejtvonalakban Proteome Profiler Human XL Oncology Array-el 84 daganat specifikus fehérje expresszióját a transzfektált és az eredeti sejtvonalakban (10. Ábra).



11. Ábra OPN siRNS transzfektált sejtek és az eredeti sejtek proteome profil analízise.

A.) Szignifikánsan változott fehérjék relatív expressziója az eredeti és transzfektált sejtekben

B.) Proteome Profiler Human XL Oncology Array membrán imagek (eredeti sejtek: WM278 and WM1617) és transzfektált sejtvonalak 278OPN- and 1617OPN-)

Az OPN-siRNS transzfektált sejtvonalakban a 84 fehérje közül 4 fehérje expressziója a csendesített sejtekben szignifikánsan eltérő expressziót mutatott (EGFR, OPN, tenascin C, Survivin, galectin-3 and enolase 2).

Az EGFR, OPN, tenascin C, Survivin fehérjék expressziója csökkent, ugyanakkor a galectin-3 and enolase 2 fehérjék expressziója a transzfektált sejtekben megnőtt, az enolase esetén a változás a kontrollhoz képest szignifikánsnak adódott. A fentiek alapján feltételezzük, hogy az OPN működésének blokkolása kombinálva más molekuláris célpontok működésének gátlásával hozzájárulhat a melanoma terápia optimalizálásához. A IV.4. alatt bemutatott eredmények jelenleg vannak elküldve közlésre, a Reviewer javaslataira a kéziratot átdolgoztuk és visszaküldtük az átdolgozott verziót (mellékelve).

Eredményeinket összefoglalva megállapítottuk, hogy az OPN emelkedett szintje jelentősen hozzájárul a melanoma sejtek progressziójához, a metasztázisképzéshez, ezért melanomákban is fontos biomarkernek tekinthető. Az eredményeket összefoglalva demonstráltuk, hogy a primer melanomákban a fokozott OPN expresszió rosszabb prognózissal társul.

Kimutattuk, hogy OPN splice variánsai (OPNa, OPNb, OPNc, OPN4 és OPN5) különböző mértékben expresszálódik a primer tumorból és metasztázisokból származó sejtvonalakban, expressziójuk heterogén, az OPN5 expressziója a legalacsonyabb.

A BRAFV600E mutáns melanoma sejtekben az OPN splice variánsok expressziója a mutációt nem hordozó sejtekhez képest magasabb. A BRAF inhibitorral szemben kialakult rezisztencia proteomikai elemzése alapján a 84 daganat specifikus fehérje közül hat (ANGPLT4, EGFR, Endoglin, FGF2, SerpinE1 and VCAM-1) expressziója megnő, a Survivin és az OPN expressziója csökken, az utóbbi a változást melanomákra először írtuk le. A fenti fehérjéknek a megváltozott expressziója arra utal, hogy a rezisztencia kialakulása több jelátviteli útvonalat érint, ezek megismerése fontos a sikeres, több targetet célzó terápiák kidolgozásában.

OPN-si-RNS-el sikeresen gátoltuk az OPN expresszióját, a sejtek proliferációját és invázióját. A metasztatizáló sejtekben az OPN a citoplazmában és a sejtmagban lokalizálódik. A magas OPN expresszió mellett az Nf- κ B p65 fehérje expressziója jelentős a sejtmagban, ami egyértelműen utal az Nf- κ B jelátviteli útvonal aktivációjára az emelkedett OPN szint esetén. Feltételezzük, hogy az OPN működésének blokkolása más targetekkel párhuzamosan hozzájárulhat a melanoma sejtek invazivitásának csökkentéséhez.

Pályázati támogatással megjelent közlemények:**Az alábbi nemzetközi folyóiratok SCImago Journal Rank értéke: Q1,****Összesített impakt faktor: 13,935**

1. Koroknai V; Szasz, I ; Hernandez-Vargas, H ; Fernandez-Jimenez, N ; Cuenin, C ; Herceg, Z ; Vizkeleti, L; Adany, R; Ecsedi, Sz; Balazs, M: DNA hypermethylation is associated with invasive phenotype of malignant melanoma. EXPERIMENTAL DERMATOLOGY 1 pp. 39-50. , 10 p. (2020)
2. Szász, I ; Koroknai, V ; Kiss, T ; Vizkeleti, L ; Ádány, R ; Balázs, M Molecular alterations associated with acquired resistance to BRAFV600E targeted therapy in melanoma cells MELANOMA RESEARCH 2019 Aug;29(4):390-400. (2019)
3. Balázs, M ; Koroknai, V ; Szász, I ; Ecsedi, S Detection of CCND1 Locus Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization, In: Santiago-Cardona, P (szerk.) The Retinoblastoma Protein, New York, Amerikai Egyesült Államok : Humana Press Inc., Springer, pp. 85-100. , 16 p. (2018)
4. Vizkeleti L, Kiss T, Koroknai V, Ecsedi S, Papp O, Szasz I, Adany R, Balazs M: Altered integrin expression patterns shown by microarray in human cutaneous melanoma. Melanoma Res. 27(3):180-188. (2017)
5. Koroknai V, Ecsedi S, Vizkeleti L, Kiss T, Szasz I, Lukacs A, Papp O, Adany R, Balazs M: Genomic profiling of invasive melanoma cell lines by array comparative genomic hybridization. MELANOMA RESEARCH 26:(2) pp. 100-107. (2016)
6. Kiss T, Ecsedi S, Vizkeleti L, Koroknai V, Emri G, Kovacs N, Adany R, Balazs M: The role of osteopontin expression in melanoma progression. TUMOR BIOLOGY 36:(10) pp. 7841-7847. (2015)
7. Balazs M, Vizkeleti L, Ecsedi S, Adany R, Raso E, Hegedus B, Ladanyi A, Tovari J, Timar J: Hazai melanoma kutatások: reménykeltő eredmények egy korábban reménytelen daganatban. MAGYAR ONKOLÓGIA 59:(4) pp. 275-281. (2015)

Közlésre elküldve: Kiss T, Koroknai V, Szász I, Jámbor K, Ádány R, Balazs M: OPN silencing is associated with decreased cell proliferation and invasion in melanoma cells. 2020.

Előkészítés alatt: Jámbor K, Kiss T, Koroknai V, Szász I, Jámbor K, Ádány R, Balazs M Osteopontin splice variants expression is associated with melanoma progression

A pályázatban résztvevő kutatók közül jelenleg 1 doktorjelölt benyújtotta, 2-en jelenleg készítik PhD disszertációjukat, melyek megvédésére 2020 első és második félévében kerül sor.

Konferencia részvételek:

1. Koroknai V, Szász I, Ádány R, Ecsedi S, Balázs M: DNA hypermethylation is associated with early invasion of malignant melanoma (poszter), 4th Annual Markets and Markets Epigenetics Congress, 2019. október 2-5, London, Egyesült Királyság
2. Jámbor K, Szász I, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M: Overexpression of intracellular osteopontin isoforms are associated with a ggressive phenotype in malignant melanoma NKE XIII. konferencia, 2019. augusztus 28 - 30., Balmazújváros
3. Koroknai V, Patel V, I. Szász, M.Balazs. Gene Expression Signature of Braf Inhibitor Resistant Melanoma Spheroid (poszter), Hungarian Molecular Life Sciences 2019. Eger, Hungary, 29-31 March, 2019.
4. Szász I, Koroknai V, Patel V, Jámbor K, Balázs M: New perspective in melanoma treatment- targeting endoplasmatic reticulum stress (poszter), Hungarian Molecular Life Sciences 2019. Eger, Hungary, 29-31 March, 2019.
5. Jámbor K, Szász I, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M: Osteopontin splice variants expression in malignant melanoma cell lines Life Sciences 2019. Eger, Hungary, 29-31 March, 2019.
6. Kiss T, Koroknai V, Szász I, Ádány R, Balázs M: Az oszteopontin expresszió szerepe a humán malignus melanoma progressziójában (előadás), NKE XIII. konferencia, 2019. augusztus 28 - 30., Balmazújváros
7. Koroknai V, Szász I, Ádány R, Balázs M: Citokin receptorok expressziója invazív melanoma sejtekben (előadás), NKE XIII. Konferencia, 2019. augusztus 28-30, Balmazújváros
8. Szász I, Patel V, Koroknai V, Kiss T, Jámbor K, Ádány R, Balázs M: A MAPK útvonal kombinált gátlásával összefüggő molekuláris eltérések vizsgálata melanoma sejtvonalakban (előadás), NKE XIII. Konferencia, 2019.augusztus 28-30, Balmazújváros
9. Koroknai V, Ecsedi Sz, Szász I, Balázs M: Methylation biomarkers of melanoma invasion (poszter), 14th EADO Congress & 9th World Meeting of Interdisciplinary Melanoma / Skin Cancer Centers 6-9 November 2018, Barcelona, Spain
10. Koroknai V, I. Szászt and Balázs M: DNA Methylation Markers of Early Stage Invasion in Primary Malignant Melanoma (poszter), CYTO2018 33rd Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, 2018. április 28-május 2, Prága, Csehország
11. Jámbor K, Szász I, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M: Osteopontin splice variánsok expressziójának vizsgálata humán malignus melanoma sejtvonalakban Tavaszui Szél Doktorandusz Konferencia, Győr, 2018.
12. Koroknai V, Ecsedi Sz, Szász I, Balázs M: A humán melanoma sejtek invazív képességének háttérében álló molekuláris eltérések vizsgálata (előadás), NKE XII. Konferencia 2018. augusztus 29-31. Budapest
13. Szász I, Koroknai V, Patel V, Jámbor K, Ádány R, Balázs M: "All that glitters is not gold"- New perspective in melanoma treatment (poszter), 14th EADO Congress & 9th World Meeting of Interdisciplinary Melanoma / Skin Cancer Centers 6-9 November 2018, Barcelona, Spain
14. Szász I, Koroknai V; Balázs M: Acquired BRAF inhibitor resistance in BRAFV600E mutant melanoma cell lines is associated with new alterations (poszter), CYTO2018 33rd Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, Prague Congress Centre, April 28 to May 2. 2018.
15. Szász I, Koroknai V, Patel V, Jámbor K, Ádány R, Balázs M: Új gyógyszerjelölt molekula hatása BRAF inhibitor rezisztens melanoma sejtekre (előadás), NKE XII. Konferencia 2018. augusztus 29-31. Budapest
16. Szász I, Koroknai V, Kiss T, Jámbor K, Ádány R, Balázs M: Új célpont a melanoma terápia hatékonyságának növelésére, NKE XI. Konferencia 2017. augusztus 31.- szeptember 2. Szeged
17. Balázs M: Development and molecular characterization of vemurafenib resistant melanoma cell line model systems, Cyto2017 Conference, 2017 June 08-15, Boston
18. Szász I, Koroknai V, Kiss T, Ecsedi Sz, Ádány R, Balázs M: BRAF inhibitorral szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusok vizsgálata melanoma sejtvonalakban NKE X. Konferencia 2016. augusztus 31.- szeptember 2. Debrecen
19. Szász I, Koroknai V, Kiss T, Ecsedi Sz, Vízkeleti L, Ádány R, Balázs M: Primer tumor és metasztázis eredetű melanoma sejtvonalak génexpressziós változásai PLX4720 BRAF kináz inhibitor hatására (előadás), NKE IX., 2015. augusztus 26-28, Pécs
20. Kiss T, Koroknai V, Ecsedi Sz, Vízkeleti L, Szász I, Ádány R, Balázs M: Géneltérések szerepe a malignus melanoma progressziójában (előadás), NKE IX. Konferencia, 2015. augusztus 26-28., Pécs