Melanóma progressziójában szerepet játszó host és tumor eredetű faktorok vizsgálata

Doktori értekezés

Barbai Tamás

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola

Konzulens: Dr. Rásó Erzsébet, Ph.D, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Méhes Gábor, Ph.D, egyetemi docens
Dr. Lászik András, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Lakatos Péter, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, Ph.D, egyetemi tanár
Dr. Patócs Attila, Ph.D, egyetemi docens

Budapest

2016

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék…… 1

2. Rövidítések jegyzéke 3

3. Bevezetés: 4

3.1. A tumorprogresszió folyamata 4

3.2. A mikrokörnyezet és a tumorprogresszió kapcsolata 8

3.3. A melanóma progressziója és terápiás lehetőségei 10

3.4. A kemokin rendszer szerepe a tumorprogresszióban 11

3.5. miRNS-ek szerepe a melanóma progressziójában 12

3.6. Extracelluláris mátrix és a kollagén XVII 16

3.7. CD44.. 18

4. Célkitűzések 20

5. Módszerek: 21

5.1. Állatkísérleti modell rendszer 21

5.2. Egysejtszuszpenzió előállítása 21

5.3. Tumor implantáció 21

5.4. Kísérleti állatok kezelése 21

5.5. Sejttenyésztés 22

5.6. Primer tenyészetek létrehozása 22

5.7. Proliferációs vizsgálat (MTT teszt) 22

5.8. Migrációs assay 23

5.9. ELISA (Ensim Linked Immunosorbent Assay) 24

5.10. RNS izolálás 24

5.11. RNS tisztítás 24

5.12. Agilent Mouse Oligo Microarray analízis 25

5.13. Reverz transzkripcó 25

5.14. PCR 25

5.15. q-PCR 26

5.16. Direkt szekvenálás 26

5.17. miRNS pool meghatározás 27

5.18. Immunhisztokémia 27

5.19. Apoptózis assay 28

5.20. Statisztikai Analízis 28

6. Eredmények: 29

6.1. Melanóma metasztatizálásában szerepet játszó host faktorok azonosítása: 29

6.2. A CCL12 és humán homológjának a CCL8 kvalitatív és kvantitatív kimutatása 31

6.3. A CCL8 proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata 35

6.4. A CCL8 migrációra gyakorolt hatásának vizsgálata 36

6.5. Host faktorként azonosított gének vizsgálata humán primer melanómákban 38

6.6. CCL8 expresszió vizsgálata humán klinikai mintából származó primer melanómákban 39

6.7. CCL8 expresszió vizsgálata melanóma progressziója során kísérletes állatmodellben ... 46

6.8. Tumor-host kölcsönhatás *in vitro* szimulációja 46

6.9. A miR146a expressziója primer humán melanómákban 50

6.10. Kollagén XVII expresszió vizsgálata humán melanóma progressziója során kísérletes állatmodellben 51

6.11. A kollagén XVII proliferációra, letapadásra, apoptózisra gyakorolt hatásának vizsgálata: 51

6.12. A CD44 melanómára jellemző splice variáns mintázata 54

7. Megbeszélés 56

8. Következtetések 64

9. Összefoglalás: 67

10. Summary 68

11. Irodalomjegyzék 69

12. Saját Publikációk 76

13. Köszönetnyilvánítás 78

2. Rövidítések jegyzéke

bp – bázispár

CTC – circulating tumour cell (keringő tumorsejt)

DMSO– dimetil-szulfoxid

DNS – dezoxi-ribonukleinsav

ECM – extracelluláris mátrix

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

ELFO – elektroforézis / elektroforetogram

EMT – epithelial-mesenchymal transition (epithelialis-mesenchymalis átalakulás)

FBS – fetal bovine serum (magzati borjú szérum)

FCS – fetal calf serum (magzati borjú szérum)

HE – hematoxilin–eozin

mRNS – messenger RNS

MTT – metil-tiazol tetrazolium teszt

PCR – polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

qPCR – quantitative polymerase chain reaction , real-time PCR (kvantitatív polimeráz láncreakció, valós idejű PCR)

RNS – ribonukleinsav

RT-PCR – reverse transcriptase PCR

scid – Severe Combined Immunodeficiency

SD – standard deviáció

SDS – Na-dodecil-szulfát

3. Bevezetés

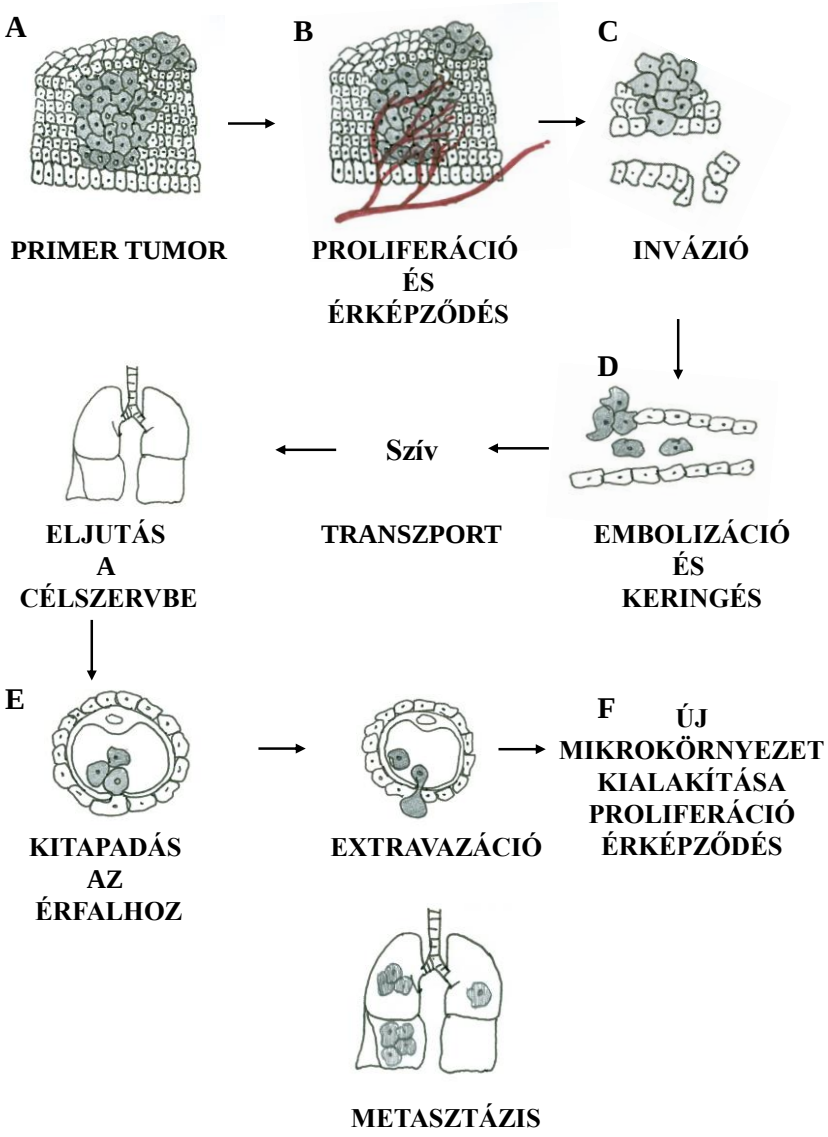
Az áttétképzés hatásmechanizmusának kutatása az esetek döntő hányadában a tumorprogresszió kaszkádszerűen egymásra épülő folyamatának lépésenkénti vizsgálatára korlátozódik, holott ez is, mint minden biológiai folyamat, olyan komplex, hálózatba szerveződő folyamatok összessége, amelynek lineáris vagy még inkább pontonként történő vizsgálata esetenként több hibát generál, mint amennyi hasznot jelent a tudomány számára. A progresszió állomásai a vizsgálatok során alapvetően két irányba, tumor és host oldalra válnak szét, ahol az előbbi a szakirodalom tanúsága szerint jóval nagyobb hangsúlyt kap. A két oldal azonban nem választható el élesen egymástól, hiszen a tumorsejtek és az őket körülvevő mikrokörnyezet kölcsönhatása az, amely nemcsak lehetőséget ad a primer tumor növekedésére, de végül elvezet az áttétképző populációk szelekciójához. Ez hozza létre az úgynevezett metasztatizáló niche-t, amely az extracelluláris mátrix átrendeződése, a növekedési faktorok termelésének és tárolásának megváltozása, valamint a kemokin környezet átalakulása révén megváltoztatja a strómális sejtek (elsősorban a fibroblasztok) aktivitását és mindez végül az angiogén fenotípus és a migrációs potenciál megszerzésén keresztül a progresszió útjára indítja az ily módon szelektálódott sejteket. Számos kísérletes adat azt igazolja, hogy – meglepő módon – ez a lokális komplexum és az általa közvetített (kémiai) információ az, amely a távoli áttétek helyének premetasztatikus, illetve metasztatikus fenotípusát kialakítva lehetővé teszi az odáig eljutó tumorsejtek számára, hogy új (áttéti) utódpopulációt hozzanak létre [1]. Az, hogy ennek a bonyolult hálózaton alapuló rendszernek mely gének a főszereplői, és a közöttük levő kapcsolat hogyan alakul (át) a metasztatikus kaszkád aktiválódása alatt, még csak részleteiben ismert, a teljes spektrum még nem rajzolódott ki a szemünk előtt.

3.1. A tumorprogresszió folyamata

A primer tumor kialakulásától a távoli szervekben történő áttétek megjelenéséig eltelt idő előre nem meghatározható és számos tényező együttes hatásának az eredménye. Míg az első áttétek megjelenésének ideje egyéntől és tumortípustól függően teljesen eltérő lehet, az odáig vezető út egyéntől és tumortípustól független közös állomásokkal jellemezhető (1/A-F ábra). A progresszió kaszkádszerűen egymásra épülő lépései

klinikailag is jól felismerhetők, s ezen klinikai stádiumoknak megfeleltethető specifikus szövettani illetve molekuláris szinten bekövetkező változások detektálhatók a folyamat során. Az élő szövetben minden pillanatban változások ezrei következnek be, azonban a legtöbb ilyen genetikai, epigenetikai változás mégsem okoz változást a funkcióban, a jól működő védelmi és hibajavító rendszereknek köszönhetően. Azonban, ha ez a rendszer valamilyen ok folytán kibillen egyensúlyi állapotából, az egymásra rétegződő folyamatok bonyolult egymásutániságában a malignitás felé orientálják az addig optimálisan működő rendszert. A genetikai eltérések a tumorbiológiában mindig a vizsgálatok középpontjában foglaltak helyet, így nem csoda, hogy napjainkig megközelítőleg 100 onkogén mutáció beazonosítása történt meg [2]. Ugyancsak nyilvánvalóvá vált, hogy egy-egy sejtben több tumorszupresszor gén is inaktiválódhat, azaz nem egy esemény felelős a komplex folyamatért, hanem azok hátterében ezeknek a genetikai hibáknak az akkumulálódása figyelhető meg. A genetikai eltérések a tumor kialakulása és progressziója során halmozódást mutatnak, azaz újabb és újabb mutációk jelennek meg, melyet jól szemléltet a korai és késői stádiumú primer tumorok mutációs mintázatának összevetése [3]. Ez alapján állították fel a karcinogenezis/progresszió többlépcsős modelljét, amelynek „motorja” minden jel szerint a tumorok genetikai instabilitása. A késői stádiumú tumorokban fellelhető több genetikai eltérés az adott populációban nagyobb variabilitást generál, és létrehozza azt a mintázatot is, (amely esetről esetre nagy valószínűséggel igen változatos és akár drámaian eltérő is lehet) amely az áttétképzés alapját képezi [4].

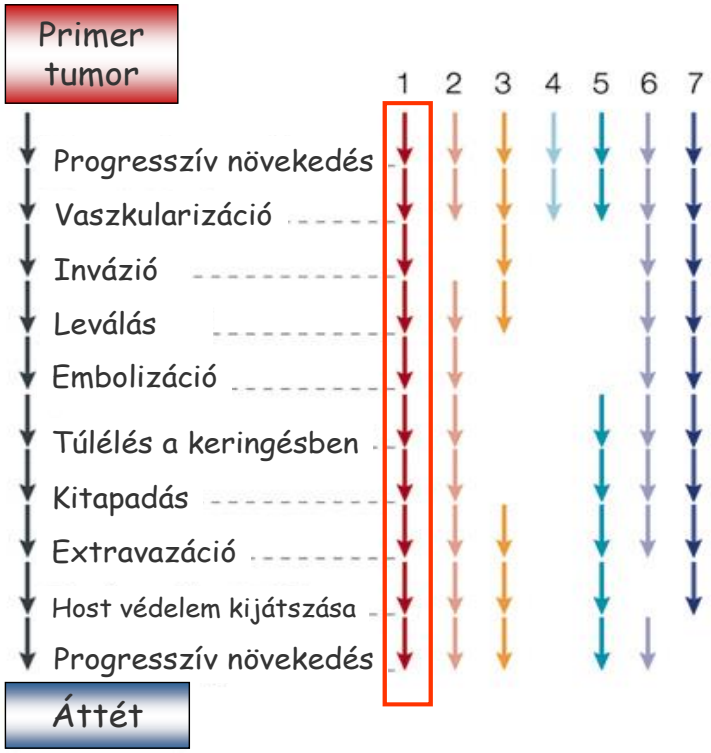
A primer tumor beereződés nélkül korlátolt határig folytathatja a proliferációját (250μm), amelyen túl vagy elindul az angiogenezis, vagy a sejtcsoport elpusztul. A tumorok neoangiogenezise többféle módon történhet, azonban a végeredmény minden esetben az, hogy az addig elkülönült sejtek halmaza bekapcsolódik a szervezet egészének hálózatába [5]. Ezek az erek egyben lehetőséget biztosítanak a tumor arra alkalmas (azaz metasztatikus fenotípussal rendelkező) sejtjei számára, hogy a felkínált „ajtón” tovább lépjenek távoli szervek felé. Az angiogén fenotípus kialakulásán túl az extracelluláris mátrix átrendeződése [6, 7, 8], mely kemokinek és növekedési faktorok raktározásával, valamint a motogén szignálok megjelenésével is támogathatja ezt a folyamatot [9].



1.ábra A progresszió vázlatos folyamata (A) a transzformáció és tumor növekedése során a neoplasztikus sejtek utódpopulációjában malignus sejtek jelennek meg. Ebben a stádiumban a tumor az expanzív növekedéshez szükséges anyagokat diffúzióval veszi fel a környezetéből. (**B)** Amikor a tumor átmérője eléri az 1-2 mm-t, a vaszkularizáció a túlélés előfeltétele lesz. Az angiogén faktorok szintézise és szekréciója a környező strómában új kapilláris rendszert alakít ki. (**C**) A lokális invázió során a vékony falú venulák ill. nyirokerek falán keresztül tumorsejtek jutnak a keringésbe. (**D**) A tumorsejtek egyesével, vagy kisebb aggregátumokat képezve keringenek az érpályában, míg méretüknél fogva el nem akadnak a kapillárisokban, ahol az endotélhez kapcsolódnak. (**E**) Az invázióhoz hasonló folyamatok során a target szervben

megtörténik az extravazáció. **(F)** A célszervben a megfelelő méretű tumorsejtpopulációban ismételten elindul az új érhálózat kialakulása

A fentebb vázolt események alapján az áttétképzés folyamatát viszonylag jól körülírható, diszkrét lépésekre tagolja az irodalom, amely azonban sokkal inkább tekinthető didaktikai eszköznek, mint biológiailag ténylegesen elhatárolt jelenségek sorozatának (2. ábra). Ez a típusú felosztás ugyanakkor lehetőséget ad arra, hogy ezeket a lépéseket egyenként megvizsgálva közelebb jussunk a teljes folyamat megértéséhez, illetve hogy az egyes egységekben megtaláljuk a daganatellenes terápiák potenciális célpontját. A metasztatikus kaszkád első lépcsőfoka a *de novo* keletkezett és már proliferáló primer tumor, amelyben nagyrészt a daganatokat jellemző genetikai instabilitás miatt megtörténik azoknak a sejteknek a szelekciója, melyek a távoli áttétek alapítói lehetnek.



2.ábra A metasztatikus kaszkád állomásai, melyet mai ismereteink szerint minden sikeres áttétet alapító tumorsejtnek be kell járnia. Minden lépést, tekintve, hogy újabb és újabb funkcionális „feladatot” jelöl ki a sejt számára, eltérő mRNS/protein expressziós mintázat jellemez.

A metasztatikus potenciállal rendelkező sejtek funkcionális elkülönülése a genetikai és fenotípusos megjelenésükben is megmutatkozhat, azaz az expressziós mintázata megkülönböztethetővé válhat – amennyiben tudjuk, mit kell keresnünk. Első megközelítésben a metasztatikus képesség feltárásában alkalmazott irányvonal tehát a tumorsejtek vizsgálatán alapul az előbbiekben ismertetett paraméterek miatt, azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy ezen sejtek a környezetüktől nem választhatóak el, azaz az őket befogadó stróma valamint a tumor és a strómális sejtek interakciója a progresszió folyamatában a tumorral megegyező mértékben vesz részt [10].

3.2. A mikrokörnyezet és a tumorprogresszió kapcsolata

Régóta ismert az a klinikai megfigyelés, hogy a tumorok áttétképző hajlama tumortípustól függően igen eltérő lehet. Ugyancsak tumortípustól függőnek bizonyult az áttétek szervi/szöveti eloszlása, amely megállapítás empirikus megfigyeléseken alapult, de tudományos/élettani hátterére sokáig nem derült fény. Stephen Paget 1889-ben állította fel „seed and soil" hipotézisét és az a mai napig helytállónak bizonyult. Munkáját megelőző elképzelések szerint az áttétet képző tumorsejtek a szervezetben bárhol kinőhetnek. Paget azonban 735 fiatal emlőrákos beteg áttéteinek eloszlását megvizsgálva megállapította, hogy a metasztázisok az esetek döntő hányadában a májban alakultak ki, azaz nagy valószínűséggel az áttétképzés nem tekinthető random folyamatnak [11]. Az elmélet azt feltételezte, hogy a tumorsejteknek speciális, növekedésüket támogató környezetre van szüksége, és ez a környezet a tumorsejttel egyenrangú kooperáló félként járul hozzá az áttétek kialakulásához. Az elmélet egy időre feledésbe merült, azonban az 1980-as években Fidler és munkatársai állatkísérleti modellekben kimutatták, hogy melanóma sejtek intravénás injektálása után a kolóniák nem a kapillárisokban történt elakadás helyén random módon keletkeztek, hanem jól megfigyelhető szervpreferenciát mutatva a tüdőben, az ováriumokban, és a vesében. Mindez annak ellenére történt, hogy az implantációt követően a tumorsejtek minden szervben kimutathatóak voltak. Ezzel közel 100 évvel a megszületését követően kísérleti úton igazolták Paget elméletét [12].

A tumorsejtek és azok mikrokörnyezetének sejtes és extracelluláris elemei a progresszió során egyaránt átalakuláson mennek át [13]. Az addig mozgásában a szomszédos sejtek és extracelluláris mátrix által korlátozott tumorsejtek, a szolubilis és kontakt stimulusok

által szabályozott regulációs szignálokkal szemben rezisztenssé válnak, ami lehetővé teszi a sejtek kilépését az addig meghatározott szöveti környezetből. Ugyanakkor a malignus sejtek stimulálják a host strómális és vaszkuláris elemeit [14,15].

Típus	**Metasztatizálás elősegítése**	**Metasztatizálás gátlása**
Tumor sejtek	Növekedési faktorok és receptoraik termelése Angiogén faktorok Sejt motilitás, invazivitás Aggregáció Speciális sejt felszíni receptorok Adhéziós molekulák	Antigenitás Angiogenezis inhibítorai Kohézió(E katherin) Proteolitikus enzimek szöveti inhibítorai
Hoszt sejtjei	Parakrin és endokrin növekedési faktorok Neovaszkularizáció, vérlemezkék és anyagaik Immunrendszer sejtjei és anyagai	Szöveti barrier-ek Proteolitikus enzimek szöveti inhibítorai Véráramlás és endotheliális sejtek Osztódást gátló faktorok Érképződés inhibítorai

3.ábra Az áttétképzés szabályozása A tumorprogresszió során a tumorsejt- és host-eredetű faktorok és a két oldal egymással történő kooperációja a folyamatot támogatni és gátolni egyaránt képesek. A támogató hatások túlsúlyba kerülésével primer tumor sejtjei számára megnyílik az út a távoli szervekbe történő áttétképzésére

Az extracelluláris mátrix - melynek fő elemei a mátrix metalloproteázok, adamalizin-kapcsolt membrán protein, BMP és szöveti szerin proteázok mint a plazminogén aktivátor, urokináz, trombin és plazmin - szintén átrendeződik [14,15]. Mindezen változások komplex együttese alakítja ki az inváziós mezőt, jóllehet az innen kilépő tumorsejtek áttétképző potenciálja eltérő lehet, azaz nem minden primer tumort elhagyó tumorsejt képes új áttéti populációt alapítani. A metasztatikus szervpreferencia kialakításának [16] - mint azt alább még részletesen kifejtem - a kemokin rendszer érintettsége is fontos eleme [17]. A metasztatikus potenciállal rendelkező tumorsejt klonális expanzió eredményeképpen létrehozza a célszervben a távoli áttétet, amelyet az új mikrokörnyezet (mint eltérő szelekciós tényező) hatására kialakuló új, a primer tumortól eltérő geno- és fenotípusos profil jellemez [18,19,20,21].

Az áttétképzésre alkalmas tumorsejtek szelekciója nagymértékben függ a primer tumort körülvevő mikrokörnyezettől. A folyamat a tumornövekedés mely időpontjában történik meg sok tényező együttes hatásától függ, bár kétségtelen, hogy bizonyos tumportípusok (pl. a malignus melanómák) a tumor kialakulásának igen korai szakaszában hajlamosak aktív áttétképzésre, míg más daganatok esetén ez ritkán és általában később (nagyobb primer tumor) következik be (pl. Wilms tumor). Természetesen, mivel random események eredőjeként jön létre, az áttétképzés ideje nem jósolható meg pontosan, legfeljebb a statisztikai valószínűségét adhatjuk meg adott tumorra jellemző paraméterek (szövettani típus, grade, életkor, nem stb.) ismeretében. A keringésben már a klinikailag kimutatható áttétek előtt is lehet tumorsejteket detektálni [22]. Szerencsére ezen sejtek nem mindegyike éli túl ezt a mechanikus és immunológia kihívásokkal teli környezetet. Ugyancsak kétséges, hogy a célszervbe eljutó tumorsejt képes-e túlélni az új mikrokörnyezet feltételei mellett. Ezt segíti elő az a jelenség is, amelyet transzgén egerekkel végzett kísérletek során írtak le, nevezetesen hogy a sejtek esetenként a távoli áttét helyén bekövetkező onkogén aktiváció következtében válnak alkalmassá az áttéti utódpopuláció létrehozására [23].

3.3. A melanóma progressziója és terápiás lehetőségei

A melanómás betegek halálát, más daganatokhoz hasonlóan, az esetek döntő hányadában az áttétek okozzák. A metasztázisok a progresszió fizikai törvényszerűségeknek megfelelően kialakulhatnak a primer tumor körül elhelyezkedő nyirokcsomókban a limfatikus progresszió révén, valamint szatellit, in tranzit metsztázisok képzésén keresztül a távoli szervekben is. Az 5 éves túlélés esélye egy nyirokcsomó érintettsége esetén 67%, ami 4 vagy több nyirokcsomó vagy in tranzit metasztázis esetén 28%-ra csökken. A szervi metasztázisok megjelenésével az ötéves túlélés helyett már csak az egyéves túlélés 59%-os valószínűségéről beszélhetünk. Tüdőmetasztázisok esetén ez az érték 57%, míg egyéb szervi áttétek esetén 41%. Az áttétek lokalizációja tehát a betegség prognózisának legfontosabb előjelzője.

A humán melanómák tényleges terápiás problémát csak akkor jelentenek a klinikus számára, ha áttétet képeznek. Ezek hiányában a primer tumor sebészi eltávolítása illetve a (II. stádiumu és operábilis III stádiumu melanóma esetén) a reginális nyirokcsomók rezekciója/palliatív terápiája végleges gyógyuláshoz vezet. Az inoperábilis III. és IV. stádiumú, valamint kiújuló (recidív) melanóma esetén több terápiás lehetőség van. A

hagyományos kemoterápiák (DTIC, Temozolomide) esetén a válaszadás 10-20% közötti és igen ritka esemény a komplett remisszió (CR). Ezért az a tény, hogy a melanóma immunogén tumor nagy elvárásokat támasztott az immunterápiák elé. Főbb képviselői az ún. immun checkpoint inhibitorok az anti–CTLA-4 (Ipilimumab), anti–PD-1 (Pembrolizumab) és a magas dózisú interleukin-2 (IL-2). A kemoterápiához viszonyítva ezen kezelések mindössze néhány hónappal növelték a betegek túlélését (OS), így az még mindig drámaian alacsony maradt. Forradalmi változást hozott a szignáltranszdukció inhibitorainak használata: a BRAF inhibitorok (a csak V600E mutációját hordozó tumorok esetén hatásos Vemurafenib és Dabrafenib), a BRAF downstream útvonalán elhelyezkedő MEK1 és MEK2 gátlása MEK inhibitorokkal (Trametinib), a multikináz inhibitorok (Sorafenib) és a KIT inhibitorok. A betegek válaszadási aránya jelentősen nőtt, azonban a várakozásokkal ellentétben a túlélésben drámai változások nem következtek be. Létjogosultsága van tehát minden olyan vizsgálatnak amely közelebb visz bennünket a melanómák áttétképzése folyamatának megértéséhez [24].

3.4. A kemokin rendszer szerepe a tumorprogresszióban

A kemokinek kis molekulasúlyú fehérjék, melyeket speciális G-protein kapcsolt sejtfelszíni receptorok kötnek meg. Szerepük számos területen kulcsfontosságú, úgymint migráció, gyulladásos folyamatok, immunválasz kialakítása, tumorok növekedése. Csoportosításuknak alapja a protein C terminálisánál található ciszteint tartalmazó reziduum mintázata, mely alapján négy nagy csoportba oszthatóak: CXC, CX3C, CC és C, mely esetben a C ciszteint míg az X egyéb aminosavat jelöl [25,26]. Funkció szerint pedig gyulladásos és homeosztatikus citokineket különíthetünk el [27]. A nevezéktan nem egységes, ezért külön figyelmet kell fordítani az egérben és emberben megtalálható molekulák azonos voltának ellenőrzésére. A kemokin rendszer számos tagjáról beigazolódott, hogy szerepet játszik a tumorprogresszió folyamatában nevezetesen a tumornövekedésben, a migrációban, az angiogenezisben valamint az epithelialis-mesenchymalis tranzícióban (EMT) [28]. A fiziológiás körülmények között a leukociták migrációjának irányításában szerepet játszó kemokinek számos esetben hasonló funkciót töltenek be a tumorsejtek szervspecifikus áttétképzésének létrehozásában [29]. A legtöbbet tanulmányozott CXCR4/CXCL12 rendszer esetében a CXCR4-et (over)expresszáló tumorok fokozott áttétképzést mutattak azon célszervekbe

(többnyire a nyirokcsomókba) amelyek CXCL12 expresszánsok voltak [30]. Ezt az összefüggést több tumor esetén (pl.: emlőrák [31], kolorektális [32], prosztata [33], melanóma [34]) is sikerült kimutatni.

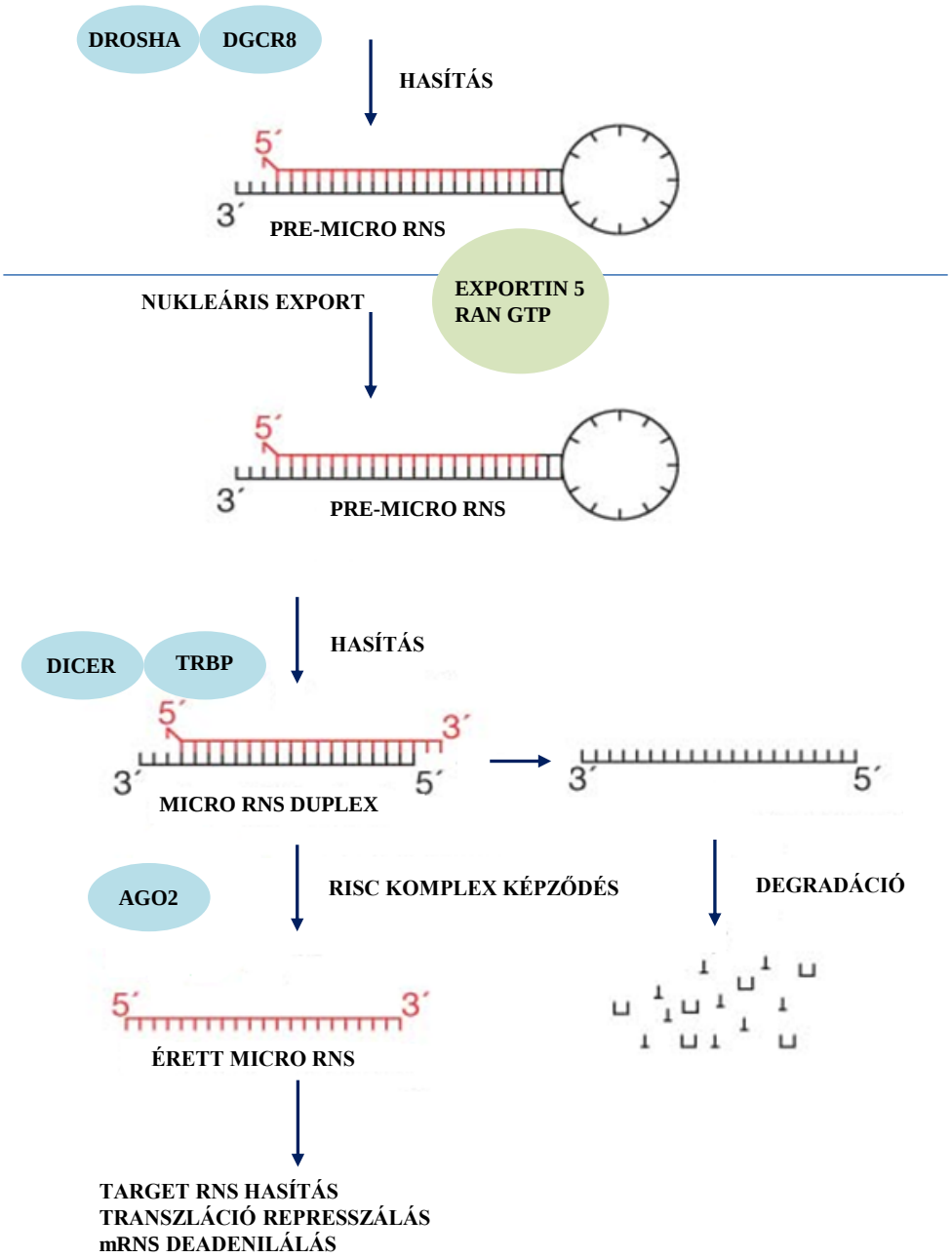
Ugyancsak egyértelmű összefüggést mutattak ki a CCR7 expresszió és a nyirokereken át a nyirokcsomókba irányuló áttétképzés között szájüregi rákok, NSCLC és melanómák esetében [35,36]. Rágcsáló izograft rendszerben a B16F10 melanómát hordozó állatokban figyelték meg, hogy CCR7-et de novo expresszáló tumorok esetén nyirokcsomó áttétek [37], míg CCR7 expresszió hiányában tüdőmetasztázisok [38] alakultak ki. Ugyanezt a jelenséget humán klinikai mintákon is igazolták. Hasonló összefüggés figyelhető meg a nyirokkeringés útján létrejövő áttétképzés és a CXCR3 expressziója között. Nevezetesen B16F10 melanóma egérmodellben kimutatták, hogy a CXCR3 expresszió elvesztése 15%-al csökkentette a nyirokcsomó áttétek előfordulását [39]. A kemokineknek a melanómák áttétképzésének targetálásában betöltött szerepét jó példázza, hogy a primer tumor magas CCR9 expressziós szintje a vékonybélbe történő metasztatizálást [40], míg a fokozott CCR10 expresszió a bőráttétek megjelenését segítette elő [41]. A 17-es kromoszóma hosszú karján található kemokin klaszter eleme a CCL8 gén is, amely mint a családjukra jellemzően szekretált protein terméke immunregulátoros és gyulladásos folyamatokhoz köthető. Több alternatív néven is megtalálható a szakirodalomban, úgymint: CCL8; CCL-8; SCYA8; MCP-2; HC14; Chemokine C-C-Motif Ligand 8; Small Inducible Cytokine Subfamily A(Cys-Cys)Member 8. A CCL8 protein egy 109 aminósavból álló prekurzorként szintetizálódik, melyből érési folyamat során hasítással jön létre az érett 75 aminósavas forma. Az általunk részletesen vizsgált, régebbi nevén MCP 2-nek nevezett CCL8 molekulát a gyulladásos reakciókban monocita ill. T-limfocita attraktáns tulajdonsága miatt vizsgálták. A CCl8-nak egérben megtalálható homológja a CCl12, mely közel 60% egyezést mutat humán megfelelőjével. A CCl8-nak mint a kemokin rendszer tagjának kevéssé ismert daganatok progressziójában betöltött szerepe. Sejtek felszínén megtalálható receptorai a CCR1, CCR2 és CCR5 melyek egyaránt a CC kemokin receptorok családjába tartoznak [42].

3.5. miRNS-ek szerepe a melanóma progressziójában

A miRNS kicsi 19-22bp hosszúságú endogén nem kódoló nukleinsav csoport, egyes becslések szerint az őket kódoló gének humán genom 3% át is kitehetik. A sejtmagban

szintetizálódó molekulák rövid érési periódus után képesek ellátni szabályozó funkciójukat, mely a szekvenciális hasonlóság alapján a génexpressziót specifikusan képes módosítani (4.ábra). Az általános fiziológiásan megjelenő szabályozó funkció mellett a patológiás folyamatokban is fontos szerepet játszanak. A miRNS-ek metasztatikus kaszkád több folyamatának irányításában is fontos szerepet játszanak, elsősorban egyes kulcsgének expressziójának szabályozása útján. Épp ezért az alábbi példákat a teljesség igénye nélkül emeltem ki, elsősorban a dolgozat témájához kapcsolható molekulákat figyelembe véve. Kísérletes vizsgálatok tanúsága szerint a miR182 ektópiás expressziója stimulálta melanóma sejtek *in vitro* és *in vivo* migrációját, down regulációja viszont serkentette annak apoptózisát és csökkentette az inváziós potenciált. A migráció serkentését ez a miRNS a MITF represszálásán keresztülvalósítja meg [43]. Klinikai minták tanulmányozása során azt találták, hogy a miR30b/30d felülszabályozása szoros kapcsolatot mutatott a melanómák metasztatikus potenciáljával, a kiújulási idővel, valamint a csökkent teljes túléléssel. A metasztatikus viselkedést a GALNT7-en keresztül az immunszupresszív IL10 szintézis növelésével érte el [44]. A miR1908, 199a-5p és199a-3p szerepét szintén kimutatták az invázió, kolonizáció és angiogenezis szabályozásában egér xenograft rendszerekben [45].

A miR214 migrációt stimuláló valamint áttétképződést elősegítő hatását *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel is igazolták, ami jól korrelált azzal a megfigyeléssel, hogy emelkedett expressziója műtéti mintákból származó humán melanómák esetén is detektálható volt [46]. Áttátképző és áttétet nem adó humán klinikai melanóma mintákban mért miR532-5p expresszió összevetésével sikerült annak az áttétképzésben betöltött szerepét igazolni. Ugyanezen vizsgálatok szerint ezt a hatást a RUNX3 regulálásán keresztül fejti ki [47]. A metasztázis propagálásán kívül az azt szupresszáló hatású mikro RNS-eket is leírtak. Így a miR34 családba tartozó miR34a/c-t, amely fokozott expressziója a p53 molekulán keresztül fejti ki a tumorsejtek invazív és generatív potenciálját csökkentő hatását [48].



4.ábra A miRNS-ek hatásmechanizmusa A miRNS-ek transzkripciójáért a sejtmagban található RNS polimeráz 2 felelős. A képződő kettős szálú primer miRNS-t az RNázIII aktivitású Drosha enzimkomplex hasítja 60-70bp hosszú pre miRNS molekulákra, majd ezek aktív transzporttal a citoplazmába jutnak, ahol a szintén RNáz hatású Dicer a terminális hurkot kivágva belőlük egy miRNS duplexet hoz létre, mely a miRNS indukált csendesítő komplexbe épül be (RISC). A komplexben a vezérszál stabilizálódása után kialakul az érett miRNS.

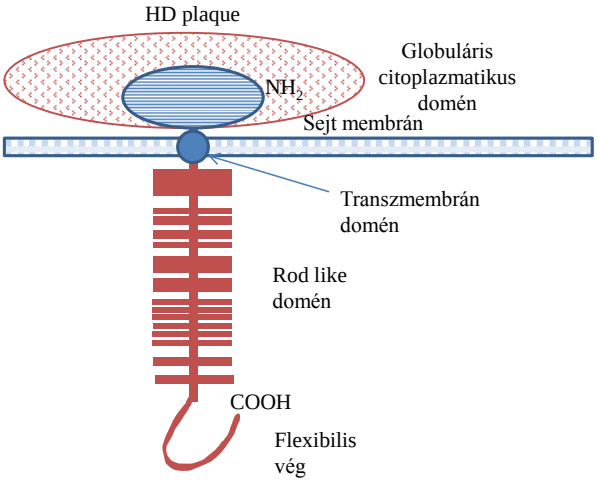
A primer melanóma proliferációjának és áttétképző képességének csökkenését figyelték meg miR200c-t overexpresszáló állatkísérleti modellrendszerben, s ezt a hatást klinikai mintákon a metasztatizáló és nem metasztatizáló primer tumorok összevetése során is kimutatták [49].

Invázió		**Angiogenezis**		**EMT**		**Intravazáció**	**Extravazáció**
Gátló	Támogató	Gátló	Támogató	Gátló	Támogató	Támogató	Támogató
Let-7 család	miR-10b	miR-21	miR-29b	miR-153	miR-29a	miR-21	miR-31
miR-7	miR-17-92	miR-23b	miR-122	miR-155	miR-103/107		miR-214
miR-9	miR-21	miR-93	miR-145	miR-194	miR-150		
miR-22	miR-23b	miR-199a-3p		miR-205	miR-221/222		
miR-26a	miR-24	miR-199a-5p		miR-212			
miR-29b/c	miR-93	miR-1908		miR-200			
miR-30a	miR-103/107			miR-122			
miR-34a/b/c	miR-135b			miR-124			
miR-122	miR-221/222						
miR-124	miR-373						
miR-125a	miR-520c						
miR-137							
miR-139							
miR-143							
miR-145							
miR-146a/b							
miR-148a							
miR-155							
miR-194							
miR-200							
miR-212							
miR-335							
miR-625							

5.ábra Tumorprogresszió és miRNS-ek A progresszió eltérő állomásain megfigyelhető és kísérletileg igazolt miRNS-ek a folyamatot gátolni és serkenteni is tudják a transzkripció szintjén befolyásolva a génkifejeződést. A jól vizsgálható folyamatok, mint például a primer tumor intenzív növekedésével kapcsolatban a széleskörű adatgyűjtésnek köszönhetően a miRNS speciesek nagy számban képviseltetik magukat.

3.6. Extracelluláris mátrix és a kollagén XVII

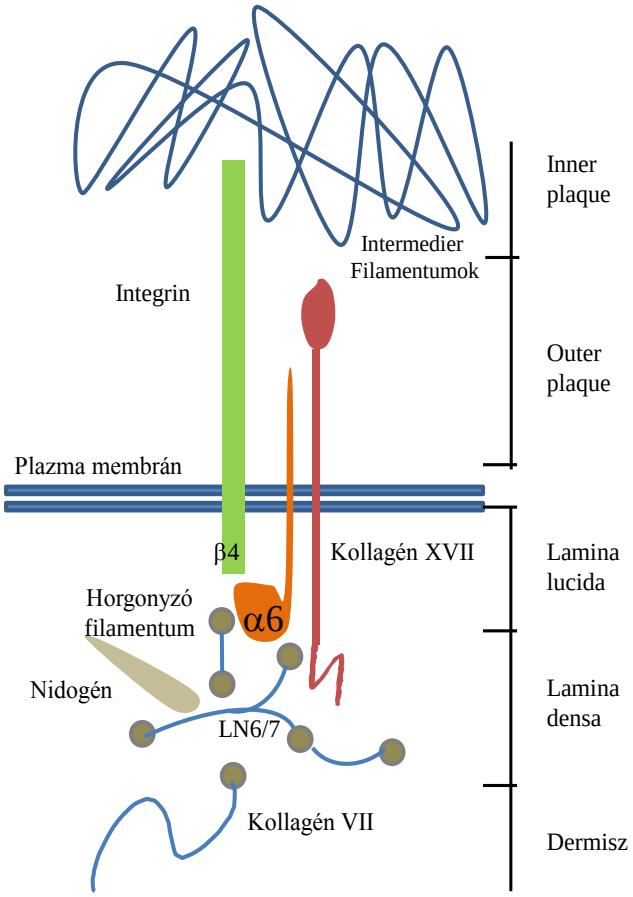
A szöveti környezet intakságának fenntartásában elengedhetetlen szerepük van az epiteliális sejtek és extracelluláris mátrix közötti kölcsönhatásnak, melynek egyik alapvető funkciója az epitelium alaphártyához történő kihorgonyzása. A mátrix és sejtes elemek közötti kapcsolat számos ok miatt módosulhat, ezáltal változtatva meg az adott szövet funkcióját. Az integrin fehérjecsalád tagjai közé tartozik a kollagén XVII is mely legalább öt tagjával képviselteti magát a sejt mátrix kapcsolatok kialakításáért felelős molekulák között [50]. A kollagén XVII egyike azon transzmembrán proteineknek, melyek az alaphártyához horgonyként rögzülnek. A globuláris N-terminális fejrész a hemidezmoszómák által alakított plakk területén, míg a C- terminális farok régió az alaphártyához kötődik. Az egész molekuláris tartószerkezet a citoszkeletonhoz kötődik (6.ábra).



6.ábra A kollgén XVII Az amino terminális globuláris doménjét követően a kollagén XVII molekula a sejtmembránban egy transzmembrán doménnel foglal helyet, mely exracellulárisan egy rod-like doménben folytatódik, mely flexibilis végben végződik a karboxil terminusnál, kialakítva a levágódó ektodomént.

A mátrix-sejt kapcsolat hemidezmoszómás kialakításában kapcsolódik még a laminin-332-höz, amit korábban laminin-5-nek neveztek, valamint a kollagén-4-hez is. A kollagén XVII ellen termelődő autoantitesteket írtak le bullózus pemphigoidban. A mátrix horgonyként funkcionáló120kDa-os molekulát fiziológiás körülmények között

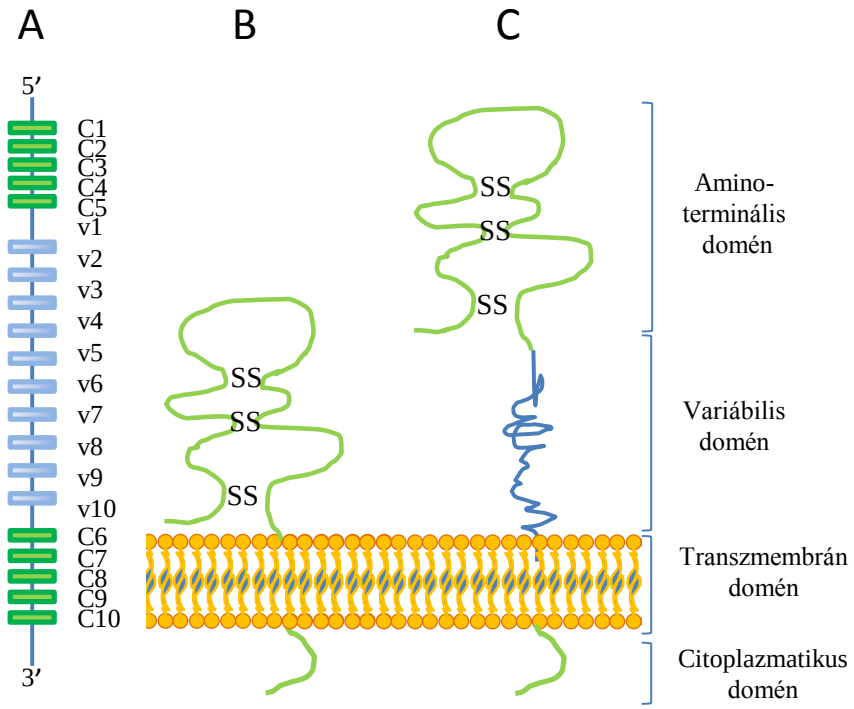
az ADAM9 és 10 metalloproteáz hasítja, s ezáltal egy 60kDa-os endodomén marad [51]. A kollagén XVII expressziója fiziológiásan a keratinociták differenciálódásához köthető, de expresszióját detektálták velősánc (neural crest) eredetű sejteken, többek között melanocita hiperplázia esetén, valamint laphámrákok (squamous cell carcinoma) és duktális pankreász rákok esetében is. A kollagén XVII protein ekto és endodoménje egyaránt expresszálódik proliferáló melanocitákban. A 60kDa-os endodomén akkumulációja pedig melanómákban volt megfigyelhető.



7. ábra A kollagén XVII elhelyezkedése A normál fiziológiás körülmények között a kollagén XVII a hemidezmoszómák kialakításával a sejteket az alaphártyához rögzíti. A kötődés kialakításában a kollagénen kívül még egyéb proteoglikánok is részt vesznek, stabil molekuláris szerkezetet hozva létre.

3.7. CD44

A sejtek felszínén található CD44 glikoproteint először T-limfoctákon mutatták ki. A molekula evolúcionálisan meglehetősen konzervált, melynek bizonyítéka, hogy egér homológjával közel 80%-os egyezést mutat. A 20 exont tartalmazó génben 10 variábilis exon található, melyeket két oldalról 5-5 nem variábilis exon fog közre (8. ábra). A variábilis exonok szintjén megjelenő változékonyság az alternatív splicing iskolapéldájának is tekinthető, az egy génről képződő variánsok széles spektrumát tekintve.



8. ábra A CD44 molekula A standard CD44 molekula **(B)** nem tartalmazza a variábilis exonokból alternatív splicing folyamán képződő variábilis domént. A CD44 gén kódoló szakaszait jelölő ábrán **(A)** jól látható, hogy a 10 variábilis exonból (v1-v10) álló régiót 5-5 exont tartalmazó konstans (C1-C5 és C6-C10) régió fogja közre. A variábilis domén a membrán mellett, annak extracelluláris oldalán található **(C)**. (A 8. ábra Helmut Ponta, Larry Sherman and Peter A. HerrlichNature Reviews Molecular Cell Biology 4, 33-45 cikke nyomán készült)

Az elsősorban hámokban és hematogén szövetekben megtalálható standard CD44 a variábilis exonokból egyet sem, vagy csak az 1-es variábilis exont tartalmazza, ezzel szemben a daganatokban a variánsok gazdag populációját lehet megtalálni [52]. A CD44 molekula protein szintű felépítésében a variábilis régiót tartalmazó domén extracellulárisan a membrán közeli részeken helyezkedik el.

A CD44 extracellulárisan heparán szulfáttal, hialuronsavval valamint egyéb poliszaharidokkal glikanálódni képes. A sejt-sejt, sejt-mátrix egyik strukturális glikozaminoglikánja a hialuronsav, melynek gyengült kötődése figyelhető meg malignus daganatokban előforduló CD44 splicing variánsok esetében [53,54].

A normál epidermális differenciációban a szöveti struktúra megőrzött, mely a progresszió útjára lépett differenciálatlan tumorszövetben felbomlik (EMT jelensége). A progressziós folyamat egyik meghatározó eleme a standard CD44 molekula mellett az új splicing variánsok megjelenése.

4. Célkitűzések

- Veleszületetten immunhiányos egerekbe (NSG, *scid*) implantált humán melanómák strómális (host eredetű) komponenséhez köthető génexpressziós változások azonosítása a daganat progressziója során 20.000 gént reprezentáló expresszió chip segítségével
- A szignifikáns változást mutató, a progresszióban potenciálisan szerepet játszó molekulák állatkísérleti és humán klinikai primer melanóma tumormintákon történő validációja,
- azoknak a tumorsejtek migrációs és proliferációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata illetve
- a tumor-host kölcsönhatás mechanizmusának *in vitro* modellezése a kooperációt szimuláló rendszerben
- Ugyanezen modellben 800 miRNS profiljában bekövetkező, a tumorprogressziót jellemző mennyiségi változások meghatározása valamint a legnagyobb változást mutató molekulák esetleges prognosztikus jelentőségének igazolása humán klinikai mintákon
- Egy, hipotetikusan az áttétképzéssel asszociálható molekula a kollagén XVII expressziós sajátságainak változása kísérleti modellünkben a xenograft humán melanóma progressziója során
- Az alternatív splicing, mint daganatos progresszióval asszociálható jelenség tulajdonságainak vizsgálata egy az izoformák átlagosnál is nagyobb számát felvonultató molekula a CD44 segítségével

5. Módszerek

5.1. Állatkísérleti modell rendszer

Kísérleteinket xenotranszplantációs modellekben végeztük, a C57Bl/6 egerekben létrejött (B6; 129S7-Rag1tm1Mom/J) mutációt hordozó *scid* (severe combined immunodeficiency) beltenyésztett egértörzs tagjaiba humán eredetű tumorsejt szuszpenziót implantálunk.

A kísérleti felállásnak megfelelően egyidőben szubkután implantáltunk humán melanóma tenyészetből származó sejteket újszülött valamint felnőtt *scid* egerek hátbőre alá.

5.2. Egysejtszuszpenzió előállítása

Az implantálásra szánt konfluens humán melanóma sejtek tenyészetéről EDTA-val eltávolítottuk a tápoldat maradékát, majd friss EDTA oldatban történő rövid inkubációval megszüntettük a sejtek egymás közt és a tenyésztőedénnyel szemben fennálló adherenciáját, s a letapadt sejtek szuszpendálhatóvá váltak. Az EDTA centrifugálással történő eltávolítását követően a sejteket 1ml RPMI 1640 médiumba vettük fel. A sejtszámot s egyben a sejtek viabilitását Bürker kamrában történő számlálással határoztuk meg.

5.3. Tumor implantáció

Humán melanóma sejtvonalak (HT199, HT168M1, WM983B) fentebb leírt egysejt-szuszpenzióját 106/50µl-es koncentrációban szubkután injektáltuk az állatok hátbőre alá. A kontrollként kezelt állatok megegyező mértékű tumormentes oldatot kaptak.

5.4. Kísérleti állatok kezelése

A kísérletek terminálását az implantációt követő 30. napon Nembuthal narkózisban végeztük el. A centrális vér nyerése szintén Nembuthal narkózis alatt történt, melyet autopszia követett.

Az állatok tartása és az állatkísérletek kivitelezése a hatályos törvényi és etikai feltételeknek megfelelően zajlott (TUKEB 83/2009).

5.5. Sejttenyésztés

A tumorsejtvonalakat (HT199 mely a SE I. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézetében lett izolálva, a HT168 és HT168M1 melyek egyaránt az A2058 kísérleti derivátumai, a WM983A ésWM983B melyek M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA) valamint A2058 LA Liotta (NCI, Bethesda, MD) ajándékai) CO_2 termosztátban 37°C-on RPMI 1640 (Lonza) tápfolyadékban tenyésztettük, mely 10% fötális borjúsavót (FCS) és 1% penicillin/streptomycin-t tartalmazott. A nem tumoros sejteket: melanocita (C-12403), keratinocita (C-12003) és dermális fibroblaszt (C-12360) (Promo Cell) primer vonalakat a gyártó által javasolt médiumokban antibiotikum hozzáadása nélkül tartottuk.

5.6. Primer tenyészetek létrehozása

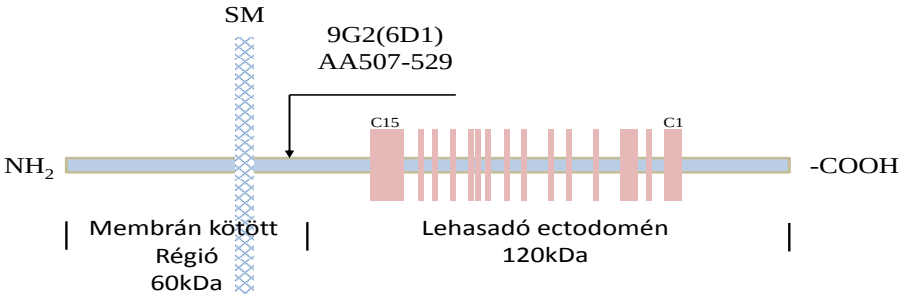
Az *in vivo* kísérletekből származó xenograft tumorok humán komponenseinek vizsgálatához szükségünk volt azok strómális sejtek nélküli tenyészetére. A tenyészeteket újszülött állatok egyfókuszú tüdőmetasztázisából valamint primer tumorából és a felnőtt állat szubkután primer tumorából mechanikai aprítást követően 6 lyukú sejttenyésztő lemezen inkubáltuk (RPMI 1640 (Lonza), 10% FCS (Sigma), 1% penicillin/streptomycin (Sigma)) tenyésztőfolyadékban. A sejtek letapadása után mosással eltávolítottuk az elhalt szövetdarabokat, majd a növekedésnek indult kultúrát 2-3 passzálással mentesítettük a nem tumoros sejtes komponensektől. Keringő tumorsejtek tenyészetét a kísérleti állatok terminálása során a szívből direkt punkcióval kivett vérmintából alapítottunk. Az EDTA-val kezelt vérminta 96 lyukú mikrotitráló lemezre történő szélesztése után többszöri mosást követően a mintában található kitapadt cirkuláló tumorsejteket nagyobb edénybe történő passzálással szaporítottuk fel.

5.7. Proliferációs vizsgálat (MTT teszt)

A sejteket a vizsgálat megkezdése előtt 24 órával 96 lyukú mikrotiter plate-re tettük 100µl-es térfogatokban $6x10^4$ sejt/ml-es koncentrációban. A rekombináns humán CCL8-al (RnD systems) történő kezelést különböző koncentráció tartományokban végeztük (50pg/ml, 500pg/ml, 1ng/ml) el. A 12 órás inkubációs idő leteltével a kezelés hatását MTT teszt segítségével tettük kvantitatívvá, melynek alapja, hogy a

metabolikusan aktív sejtek endocitózissal felveszik a tetrazólium kristályokat és formazánná alakítják át. A sejteknek ezt a formazán tartalmát DMSO-ban oldva 570nm-en fotometriával Bio-Tek Microplate Reader (Merck) detektáltuk a kontroll és a kezelt sejtek esetén egyaránt. Az abszorbancia arányos az élő sejtek számával.

A kollagén XVII kezelés IgG2b kontroll alkalmazása mellett történt 1:25, 1:50 és 1:100 arányú hígításban alkalmazva a 0,25mg/ml-es koncentrációjú 9G2 antitestet. Az antitest felismerő régiója az endodomén extracelluláris részénél található (AA507-529) (9. ábra).



9. ábra A kollagén XVII elleni antitest kötődési helye A 9G2 antitest kötődési helye a molekula extracelluláris részén a lehasadó ektodomén előtt található.

5.8. Migrációs assay

A mérést xCELLigence rendszerben (Roche) CIM (Cell Invasion Migration) plate-n végeztük a gyártó előírásának megfelelően. A vizsgálat megkezdése előtt a sejtek konfluens tenyészetéből a egysejtszuszpenziót hoztunk létre és ebből a megfelelő mennyiséget a vizsgáló lemezre juttattuk. A vizsgálat során a kezeletlen kontroll tenyészet migrációs aktivitásához viszonyítottuk a kezelésnek alávetett (HT168, WM983A melanóma valamint fibroblaszt és melanocita) sejtvonalakat. A 20000/sejt induló sejtszámmal induló tenyészeteket a hatóanyaggal ekvivalens mennyiségű PBS-sel (kontroll), 1ng/ml valamint 10ng/ml-es koncentrációjú CCL8-al (RnD Systems) kezeltük kétféle stratégia szerint. A vizsgáló plate egy két kamrából álló berendezés melynek alja speciális vezetővel van ellátva mely a sejtek szigetelő hatása lévén fellépő impedanciát méri. A két térfél egymástól egy meghatározott pórusméretű (8µm) membránnal van elválasztva, melyen a sejtek aktívan át tudnak jutni. Direkt kezelés során a kemokint a sejtek tápfolyadékába juttattuk. Kemoattraktánsként a sejteket CIM-

Plate 16 rendszerben elhelyezve (Roche) a kemokin az alsó kamrában volt a direkt kezelésnek megfelelő koncentrációban. A mérés teljes 25 órás időtartama alatt 5 percenként történt az adatgyűjtés. A sejteket mindkét esetben polyethylene terephthalate (PET) membrán választja el az alsó kamrától és azok a membrán mentén vagy azon keresztül történő mozgását az impedancia mikroelektródás mérésével tettük kvantitatívvá, melyet az ezzel arányos úgynevezett 'cell index' jelez.

5.9. ELISA (Ensim Linked Immunosorbent Assay)

Melanómás betegek szérum CCL8 koncentrációinak meghatározására Humán CCL8 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)-et használtunk, a gyártó által mellékelt protokoll szerint. Az első lépésben a 96 lyukú mikrotitráló lemezeket a CCL8 specifikus antitesttel vontuk be (coat-oltuk), amelyre rövid (3 x 5 min) mosást követően a betegekből származó minták 100µl-es mennyiségeit hígítatlanul mértük fel. Egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Minden mintát duplikátumként kezeltünk, melyek átlagával számoltunk a vizsgálat folyamán. Az inkubáció letelte után PBS-sel történő mosást (3 x 5 min) követően a második CCL8 specifikus antitesttel jelöltük (60 min/szobahőmérséklet), majd mosást követően a reakció előhívását a gyártó által mellékelt előhívó rendszerrel végeztük el. Az eredményeket két hullámhosszon mértük 450 és 540 nm-en fotometriával Bio-Tek Microplate Reader (Merck) segítségével. Hígítási sorként a kit részét képző rekombináns humán CCL8-at használtunk, melyet szintén duplikálva vittünk fel a mikrotitráló lemezre.

5.10. RNS izolálás

A mintákból TRI REAGENS (Sima) segítségével a gyártó által mellékelt protokoll szerint totál RNS-t izoláljuk, Az RNS preparátumot 100µL DEPC kezelt vízben oldva -70°C-on tároltuk.

5.11. RNS tisztítás

Az RNS mintákat DNázos emésztéssel az esetleges genomiális DNS szennyezéstől mentesítettük. Az enzimatikus tisztításhoz a DNA-free Kit-et (Ambion) használtuk és az eljárást a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el.

5.12. Agilent Mouse Oligo Microarray analízis

Az általunk használt Agilent Mouse Oligo Microarray 20.000 expresszált egér gén kimutatására alkalmas nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai vizsgáló platform. A specificitást a 60bp hosszúságú szilárd hordozóhoz kapcsolt oligonukleotid próbák biztosítják. A vizsgálat során kereszthibridizáció valósul meg, azaz a mérendő mintapárokat eltérő festékkel jelölve, a leolvasás során egyszerre detektáljuk a kétféle fluoreszcens jelet. 5µg totál RNS-t a kontroll és 5µg totál RNS-t az újszülött állat primer tumorából Cy5 és Cy3 fluoreszcens festékkel jelöltünk. A jelölt mintákat 16 órás 60°C-on történő inkubáció alatt hibridizáltattuk a gyári chip felületéhez, majd Agilent DNA microarray scannerrel olvastuk le. A nyers adatok feldolgozását, mint a háttér felvétele és kivonása, adatpontok lineáris normalizációja az Agilent Feature Extraction Software-vel történt.

5.13. Reverz transzkripcó

A reverz transzkripcióhoz 1µl 10mM dNTP mix (Qbiogene) és 1µl Random primer-oligo dT kombinációt (végső koncentráció: 2.5 µM) adunk 2 µg tisztított totál RNS-hez. 10 perces 70°C-os inkubáció után 2 µl 10x M-MLV Reverse Transcriptase Buffer-t (Sigma), 1µl M-MLV Reverse Transcriptase-t (200 unit/µl, Sigma), 0.5 µl RNase Inhibitor-t (40 unit/µl, Ribo Lock Fermentas) és 6.5 µl DEPC kezelt vizet adunk (végső térfogat: 20 µl) hozzá, ezt követően 50 percig 37°C-on, majd 10 percig 85°C-on inkubáltuk. A reverz transzkripció megtörténtét egér illetve humán β2-mikroglobulin valamint béta-aktin mint housekeeping gén primerekkel végzett PCR reakcióval igazoltuk. Negatív kontrollként és a lehetséges DNS szennyeződés kizárására ugyanazon minta RNS-ét, non-templát kontrollként pedig DEPC-kezelt vizet használunk.

5.14. PCR

A PCR 25 µl végtérfogatban 1.00 pM/reakció primerkoncentráció és AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Life Technologies) a gyártó általi protokoll szerinti alkalmazásával az alábbi paraméterek mellett történt: pre-denaturáció 95°C 10 perc, majd 38 cikluson keresztül az alábbiak szerint: denaturáció 95 °C 1 perc, primer annelálás 55 °C 1 perc,

lánchosszabbítás 72 °C 2 perc befejezésül: 72 °C 4 perc. Az alkalmazott primereket táblázatos formában közöljük (10. ábra).

Egér specifikus primer			
Gene Name	Ref. Seq. Number	Sense primer	Antisense primer
Hipothetical Protein	AK028081	TCTTCCAGCCTGCCACTTAC	TGACTCCTCTTCTTGCCGC
Lass 5	NM_028015	AAGCAACTGGACTGGAGTGT	GAGAGTGGCTGATACGGATAGT
DEAD box 60 polypeptide	NM_001081215	GAGTACAATACGCAAGTGACAGA	TTGGAACTCCTGGACTAAGCAA
Unknown EST	AK050866	AGGAAGAACACCACAGACCAA	TATGACTACTTGTGCTCTGCCT
CCL11	NM_011330	GGCTTCATGTAGTTCAGATGG	GCTGCTATTATCCTCAGTTACTCC
Pex 2	NM_008994	TGACAGACCGCCTCCTTGG	ATGACCAGCAGCACCAGTAA
Cathepsin L	NM_009984	CGCAAGCCATCCGTCTCT	GTGTCCATAAGTCCTCATTACCG
CCL12	NM_011331	CTGGTTCCTAGCTCCCCTAGC	TGGCTGCTTGTGATTCTCCT
Ninein	NM_008697	AGAAGCGAGTCAGCGAGC	CTCACCTTCTCCTCAGTCCAG
B2M	NM_009735	AACACAGTTCCACCCGCC	GTAGACGGTCTTGGGCTCG
Human specifikus primer			
Gene Name	Ref. Seq. Number	Sense primer	Antisense primer
Beta Actin	NM_001101	TCTGGCACCACACCTTCTAC	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC
CCL8	NM_005623	TTCTGTGCCTGCTGCTCATG	TTGGATGTTGGTGATTCTTGTGTAG
CCR1	NM_001295.2	GGACTATGACACGACCACAGA	GCCAGGTTCAGGAGGTAGATG
CCR2	NM_001123396	AACGAGAGCGGTGAAGAAGTC	GGTTGAGCAGGTAAATGTCAGTC
CCR5	NM_000579.3	CTGCCTCCGCTCTACTCAC	TGAAGAAGATTCCAGAGAAGAAGC
DEAD box 60 polypeptide	NM_017631	TTACAAGAAGATGATCGGCAACTC	CCATACAGTAGTAGGAGGCATAGG
Cathepsin L	NM_001912	GGCAACACACAGAAGATTATATGG	GATTTGGGAAGATCAAGAAACAGAG
Pex 2	NM_000318	GGTGGTTAGAAGAACGATGCTATG	TCTGGACATTGATAAGTGGTAAGAG
Lass 5	NM_147190	CTAAATTCTGTGAAAGCATGTGGAG	GTTGATGTAGGAGAAGGAGATAAGC

10. ábra A vizsgálatokban alkalmazott primerek

5.15. q-PCR

A célgén expressziójának specifikus mérésére q-PCR-t alkalmaztunk a következő feltételekkel: 25 µl reakciótérfogatban 12.5 µl 2x ABsolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), 0,5-0,5 µl mindegyik primerből 200 nM-os végkoncentrációban és 11,5 µl higított cDNS. A reakció feltételei: 8 perc DNS polimeráz aktiváció 95°C-on, 55 cikluson keresztül 95°C 30 sec, 62°C 30 sec és 72°C 1 perc. A vizsgálat tárgyának relatív kiindulási mennyiségét K562, B16 valamint kevert (humán+egér) sejtekből származó cDNS hígítási sorának a vizsgált termék PCR alapján kapott görbe, ill. a saját housekeeping expresszióra való normalizálás alapján végeztük el.

5.16. Direkt szekvenálás

Vizsgálataink során a PCR reakciók autentikus voltáról a reakciótermékek direkt szekvenálásával győződtünk meg. Agaróz gélen megfuttatva, majd a megfelelő band-eket a gélből kiemelve EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic) segítségével izoláltuk vissza a PCR terméket. A szekvenáló reakciót a gyártó

utasításainak megfelelően BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ – Life Technologies™) segítségével végeztük el. A minták tisztítását (BigDye® XTerminatorTM Purification Kit – Applied Biosystems™ – Life Technologies™) követően a szekvenálási reakció eredményét, azaz a nukleotid szekvenciát 3130 Genetic Analyser-el (Applied Biosystems) határoztuk meg. A minták értékelése NCBI adatbázis használatával történt.

5.17. miRNS pool meghatározás nCounter assay (nanoString) segítségével

A miRNS pool minőségi és mennyiségi vizsgálatát nCounter assay (nanoString)-vel végeztük. A módszer 800 humán miRNS párhuzamos kvantitatív mérésére ad lehetőséget ugyanazon mintából. A kiindulási mintakoncentráció 100 ng totál RNS, melyen amplifikáció nélkül történik a mérés, s ezáltal a mennyiségi vizsgálatok pontosabb képet adnak. A detektáláshoz fluoreszcensen jelzett próbákat használva nCounter Digital Analyzer-el történt a kiértékelés. Az adatok normalizálásához a rendszer 6 pozitív és 6 negatív miRNS kontrollt használt valamint 5 mRNS kontrollt. A normalizált adatokon az egyes miRNS fajták mennyiségi összehasonlítása az egymáshoz viszonyított változások mértékével valamint a totál miRNS mennyiségekkel egyaránt jellemezhetőek.

5.18. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatot formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) metszeteken végeztük. Deparaffinálást követően a metszeteken mikrohullámon történő feltárást (pH=6 citrát puffer) majd háttér blokkolást (Image-IT FX Signal enhancer - Amersham) végeztünk. A primer anti-CCL8 egér monoklonális antitesttel (Santa Cruz) egy éjszakán át, 50 x-es hígításban inkubáltuk a mintákat. Reggel a lemezeket 2x mostuk PBS-sel majd 1 órán keresztül másodlagos biotinilált (anti-egér) antitesttel inkubáltuk (Santa Cruz). A reakciót avidin-biotin peroxidáz kezelést követően NovaRED^{TM} Substrate (Vector Burlingame, CA) segítségével hívtuk elő. Az erősen pigmentált humán melanóma minták esetében kálium permanganátos/oxalátos depigmentációt végeztünk. Negatív kontrollként primer antitest nélküli teljes protokollon átment mintákat használtunk.

5.19. Apoptózis assay

Humán melanóma sejteket 24 lyukú sejttenyésztő lemezen tenyésztettünk, $2x10^5$-en kiinduló sejtszámmal. A 80 %-ban konfluens tenyészeteket 9G2 antitesttel kezeltük, A kezelt tenyészetek tápfolyadékát 24 és 48 óra múltával eltávolítottuk, majd a letapadt sejteket EDTA-val felszedtük. A sejteket PBS-ben történő mosást követően 70%-os alkohollal fixáltuk. 30 perces fixációs idő letelte után a sejteket lecentrifugáltuk, majd propídium jodidos festést követően (Partec GmbH, Munster, Germany) az apoptotizált sejtek arányát a normál sejtekhez képest Partec Cy Flow SL készülékkel határoztuk meg.

5.20. Statisztikai Analízis:

A statisztikai analízisek StatSoft Statistica 11 szoftver segítségével történtek. A t-próba alkalmazásánál szignifikáns különbséget a $p<0.05$ szint figyelembevételével határoztuk meg. A viabilitási és migrációs teszteket ANOVA analízissel értékeltük.

6. Eredmények

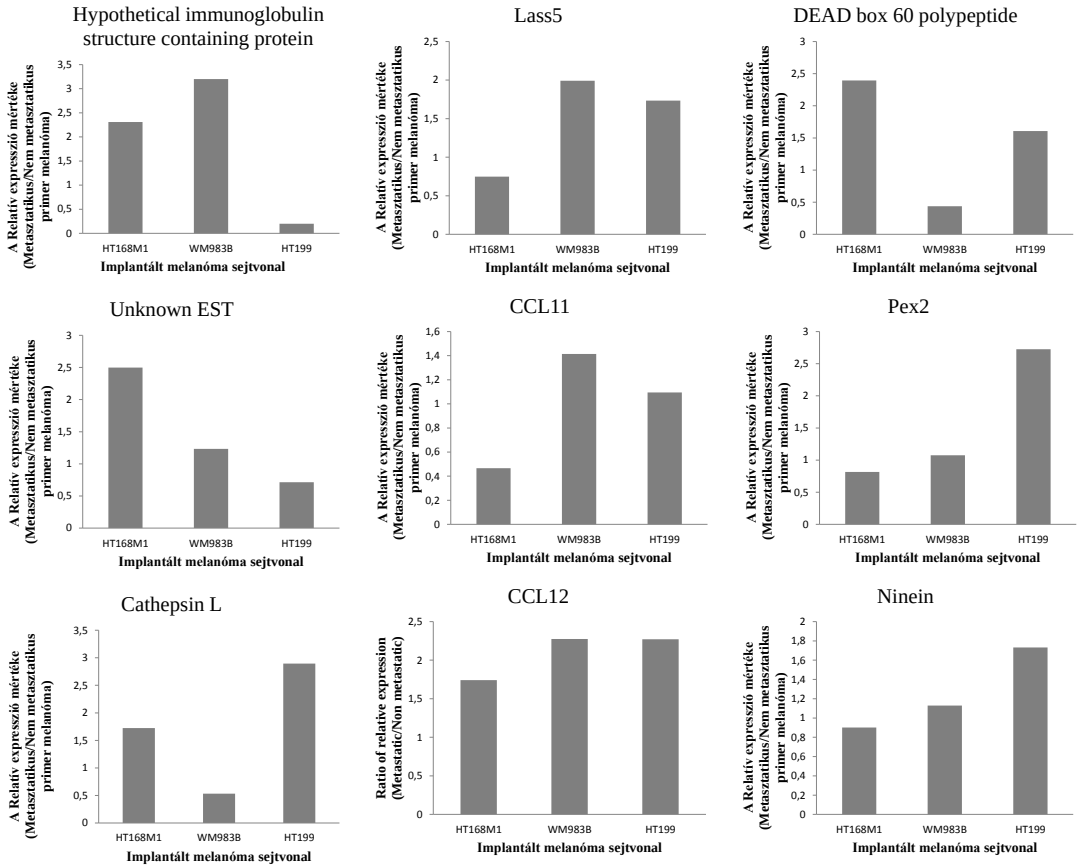
6.1. Melanóma metasztatizálásában szerepet játszó host faktorok azonosítása:

A metasztatikus kaszkád során a mikrokörnyezetben aktiválódó, ill megváltozott expressziójú gének azonosítását xenotranszplantációs *scid* állatmodell segítségével végeztük. Humán melanóma sejtvonal (HT168M1) egysejtszuszpenzióját egyidejűleg kifejlett és újszülött *scid* egerekbe implantálva mindkét hostban kialakul primer tumor, de áttétképzést csak az újszülöttbe oltott tumorok esetén tapasztalunk. Az oltást követő 25. napon a kísérlet terminálását követően a metasztatikus gazdaszervezetből származó primer tumorból mRNS-t izoláltunk, majd a 20.000 gént tartalmazó Agilent Mouse Oligo Microarray platformon vizsgáltuk a hostra jellemző expressziós mintázatot. A metasztatikus primer tumorban megjelenő strómális expressziós változásokat azonos életkorú egészséges kontrollhoz viszonyítottuk, ami lehetővé tette a hostban a tumor által indukált változások detektálását (11.ábra). A kvantitatív eredmények kiértékelését követően leválogattunk 19, szignifikánsan magas expressziós változást mutató gént és a továbbiakban ezek vizsgálatával folytattuk munkánkat.

Sequence description	Sequence	Ratio
Mus musculus family with sequence similarity 187, member B (Fam187b), transcript variant 1,	NM_175240.4	0.4
Hypothetical protein	AK012372	0.12
Ceramide synthase5; CERS5/LASS5/TRH4	NM_028015.2	0.04
Mus musculus cysteine-rich transmembrane module containing 1(Cystm1)	NM_001081365.1	8.13
Mus musculus heat shock protein 12A (Hspa12a), transcript variant X2	XM_006527378.2	8.71
Mus musculus stromal antigen 1 (Stag1)	NM_009282	8.71
Mus musculus ninein (Nin), transcript variant 1, mRNA	NM_001081453.1	8.79
Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 12 (Ccl12)	NM_011331	9.77
Mus musculus cathepsin L (Ctsl)	NM_009984	10.68
Mus musculus RIKEN cDNA 1110037F02 gene (1110037F02Rik)	NM_001081183.1	10.88
Mus musculus peroxisomal biogenesis factor 2 (Pex2)	NM_008994	11
Mus musculus oxysterol binding protein-like 3 (Osbpl3)	NM_027881.3	11.09
Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 11 (Ccl11)	NM_011330	11.62
Mus musculus antimicrobial mRNA sequence	AF062528	13.18
Mus musculus keratin associated protein 28-13 (Krtap28-13)	XM_896507	13.38
Mus musculus lymphoid nuclear protein (LAF-4)= AF4/FMR2 family, member 3 (Aff3)	U34361/XM_006495737	14.7
Mus musculus Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide (Fcer1g)	NM_010185	20.24
Mus musculus predicted gene 4262 (Gm4262), long non-coding RNA	NR_040518.1	21.38
Mus musculus DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60 (Ddx60)	XM_006509394	67.61

11. ábra Humán melanóma (HT168M1) *scid* egérbe történő szemiortotópikus implantációját követően meghatározott, a primer tumorra jellemző host eredetű faktorok, amelyek relatív expressziós szintje a tumormentes kontrollhoz képest a legnagyobb különbséget mutatta. A továbbiak során ezeknek a géneknek az expresszióját vizsgáltuk *in vivo* növekvő humán xenograft melanómákban.

Nevezetesen három, genetikailag eltérő humán melanóma sejtvonalból (HT168M1, HT199, WM983B) származó mintán kvantatatívan meghatároztuk expressziójuk mértékét. A valósidejű PCR reakcióhoz használt primerek species-specificitását (amely bizonyította, hogy valóban a hostban megjelenő változást detektáljuk) az adott gént expresszáló pozitív humán és egér eredetű sejtvonalakon mindkét irányban ellenőriztük. Csak azt a primert tartottuk validnak, amely a target species-ben egyértelmű jelet adott gélelektroforézis során és a párhuzamos speciesben egyértelműen nem adott jelet, jóllehet abban saját species-specifikus primerével egyértelműen igazoltuk a megfelelő gén expressziójának jelenlétét. Az szűrési feltételeknek mindösszesen kilenc gén felelt meg, azaz itt tudtuk csak megfelelő biztonsággal elkülöníteni az adott gén humán és egér megfelelőjét. A PCR termékek azonosítását direkt szekvenálással minden esetben elvégeztük. A továbbiakban mindhárom melanóma sejtvonal *in vitro* tenyészetéből valamint az újszülött és felnőtt állatokban szubkután növekvő primer tumorából mRNS-t izoláltunk és valósidejű PCR segítségével meghatároztuk a target gének relatív expressziójának mértékét (12. ábra). Az előzetesen szelektált gének közül a Fam 187b, Lass5, DEAD box 60 polypeptide, Gm4262, CCL11, Pex2, Cathepsin L, CCL12 és a Ninein kvantitatív validálását tudtuk elvégezni megbízhatóan species specifikusnak bizonyult primerekkel. Kiindulási feltételeink szerint az áttétképzéssel az a hostban létrejövő változás hozható összefüggésbe amely az áttéképzést „megengedő" újszülött modellből származó mintákban bármely irányban következetesen eltér az áttétet soha nem képző felnőtt állatból származó mintákban mért expresszió mértékétől. A három sejtvonalból kettő esetén mért 1.5-szörösnél magasabb expressziós különbség esetén találtuk az adott gént további vizsgálatra alkalmasnak. A 12. ábra tanúsága szerint a vizsgált gének közül a Hypothetical Immunoglobulin structure containing protein (Fam 187b), a Lass5, a DEAD box 60 polypeptide, a CathepsinL és a CCL12 felelt meg ezen kritériumoknak.



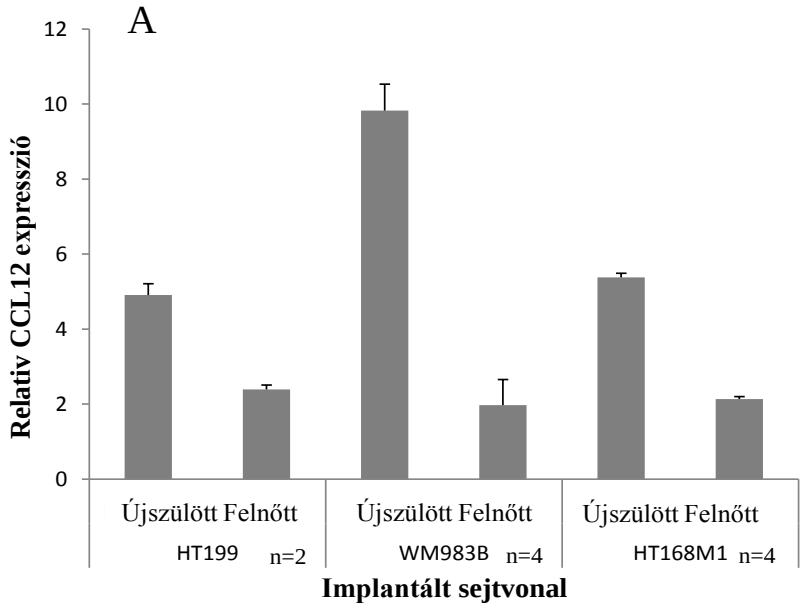
12.ábra A validálásra kiválasztott géneket három különböző humán melanóma sejtvonal *scid* egérbe történt szemiortotopikus implantációját követően az állatokból származó primer tumorokból izolált mintákban valósidejű PCR méréssel határoztuk meg. A metasztatikus vs. nem metasztatikus modellben mért relatív (B2M housekeeping génhez viszonyított) mennyiségeket egymás hányadosaként adtuk meg.

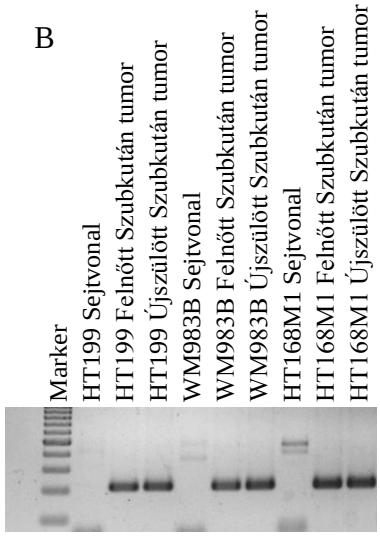
6.2. A CCL12 és humán homológjának a CCL8-nak kvalitatív és kvantitatív kimutatása

A stróma és a tumor genetikai azonossága miatt PCR-technikával nem eldönthető, hogy az adott gén mely komponensben expresszálódik, ezért első lépésben megvizsgáltuk, hogy a tumorsejtvonalak közül az említett gének humán megfelelői expresszálódnak-e. A vizsgált sejtvonalak közül a CCL8 kivételével mindegyik expresszálta az állatmodellből validációra kiszelektált géneket, s így az összesített kép alapján egyetlen gén volt az, amely valamennyi szűrési feltételünknek megfelelt: a CCL12 és annak megfelelő humán homológja a CCL8. Ennek oka részben az a tény, hogy mindkét hostban (metasztatikus és nem metasztatikus) minden implantált tumor esetében detektáltuk a CCL8 kemokin egér homológjának (CCL12) expresszióját (13/B ábra) és

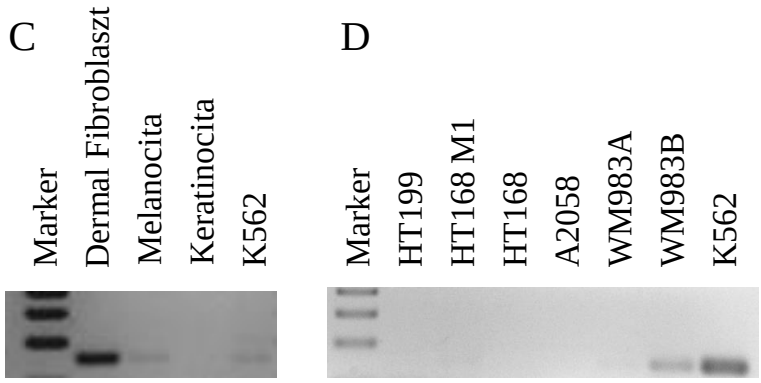
a kétféle hostban fennálló különbség mindegyik implantált sejtvonal esetében szignifikánsnak bizonyult. Köztük a relatív expressziós szintben megközelítőleg kétszeres különbséget figyelhettünk meg (13/A ábra). Ezzel ténylegesen egy olyan „jelöltté” lépett elő amely szerepet játszhat az áttétképzésre alkalmas tumorsejtek szelektálásában.

A tumor-host relációban a tumor oldal vizsgálata volt a következő lépés. Kvalitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy egy kivételtől (WM983 B) eltekintve a vizsgált melanóma sejtvonalakban ez a gén (HT199, HT168M, WM983A, A2058) *in vitro* nem expresszálódott (13/D ábra). Ugyanakkor még mindig *in vitro* tenyészeteken igazoltuk, hogy a CCL8-at a humán dermális fibroblasztok valamint melanociták egyaránt expresszálják (13/C ábra). Annak eldöntésére, hogy mely sejttípusok a potenciális targetjei a CCL8-nak meghatároztuk, hogy a tumor-host kölcsönhatás normál (dermális fibroblaszt, keratinocita, melanocita) és tumoros (HT199, HT168M, WM983A, A2058) szereplői közül mely sejtek rendelkeznek a CCL8 fogadására alkalmas receptorokkal. Nevezetesen meghatároztuk a CCR1, CCR2 és CCR5 expressziót a fent felsorolt sejttípusok „tiszta”, azaz *in vitro* tenyészeteiben. A nem tumoros sejtek közül egyedül a dermális fibroblasztokban detektáltunk (CCR1), míg a tumorsejtvonalak között a HT199, HT168 valamint a WM983A esetében mutattunk ki CCR1 expressziót (13/E ábra) Mivel már tisztában voltunk a rendszer szereplőinek kemokin/receptor expressziós mintázatával, a következő lépés a funkcionális hatások feltérképezése volt.

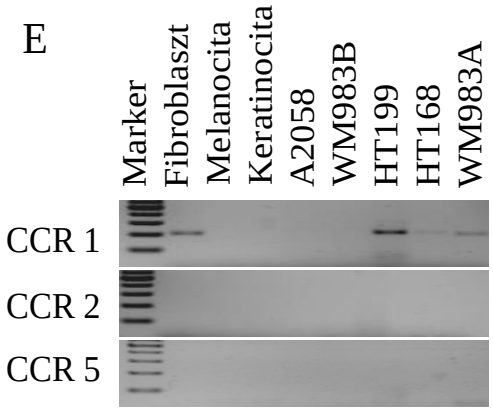




13.ábra (A) Három genetikailag eltérő humán melanóma sejtvonalat (HT199, WM983B, HT168M1) implantáltunk szemiortotopikusan eggyidejűleg újszülött és felnőtt *scid* egerekbe. A primer tumorok kifejlődése után azokból RNS-t izoláltunk, majd kvantitatív PCR méréseket végeztünk. A CCL12 relatív expressziós szintjében mindhárom sejtvonal esetében több mint 1,5 szörös különbség volt megfigyelhető a metasztatikus (újszülött) és nem metasztatikus (felnőtt) primer tumor között. **(B)** A kvalitatív CCL12 kifejeződés jól mutatja, hogy a humán és egér homológok elkülönítése jól működik, s a mérések a host-specifikus formát mutatják ki



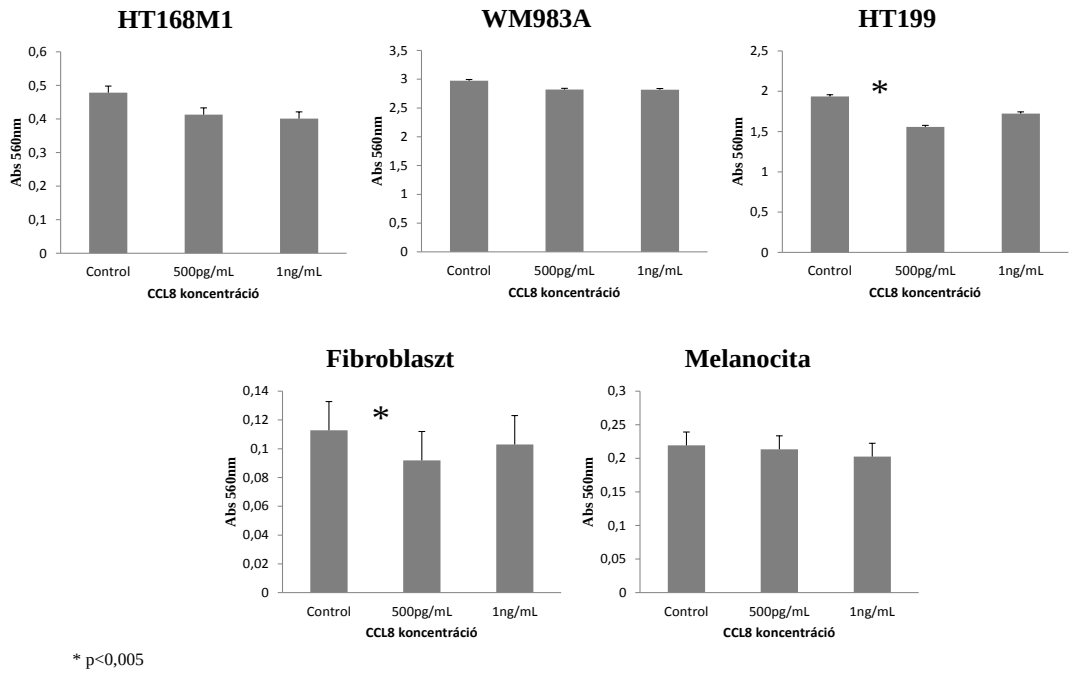
13.ábra (C) A CCL12 humán homológja a CCL8 kifejeződését nem tumoros sejteken is megvizsgáltuk. A pozitív kontroll a CCL8-at konstitutívan expresszáló K562 sejtvonal volt. **(D)** Hat különböző melanóma sejtvonal esetén mindösszesen egy esetben (WM983B) detektáltuk a CCL8 expresszióját.



13.ábra: **(E)** A CCL8 receptorainak (CCR1, CCR2 és CCR5) expresszióját nem tumoros és tumorsejtvonalakon is megvizsgáltuk. Normál sejtek közül a dermális fibroblasztok és melanociták, míg a tumorsejtvonalak közül a (HT199, HT168, WM983A) esetében tudtuk kimutatni az expresszálódó CCR1 receptort.

6.3. A CCL8 proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata

Első lépésben MTT teszt segítségével meghatároztuk a CCL8 dermális fibroblasztokra, melanocitákra illetve azon tumorsejtek proliferációjára gyakorolt hatását melyeknél CCR1 receptor (mely a CCL8 hatásért felelős) expressziót mutattunk ki. A proliferációra gyakorolt hatást kezeletlen kontrollhoz viszonyítva három különböző koncentrációjú CCL8 jelenlétében végeztük el. A kezelés 12 órás időtartama után értékeltük ki a proliferációs aktivitásokat. A tumorsejtvonalak közül a HT199, míg a host sejtjei közül a dermális fibroblasztok esetében tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget. Mindkét szignifikáns változás esetében 500 ng/ml volt a hatásos koncentráció, mely proliferációt gátló hatásúnak bizonyult (14. ábra).

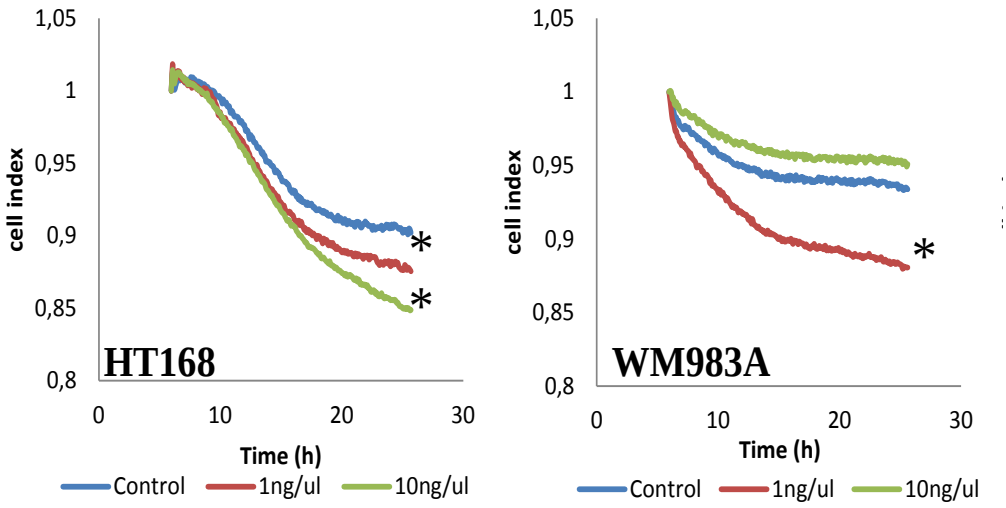


14. ábra A CCL8 tumorsejtek (HT168, WM983A, HT199) valamint dermális fibroblaszt és melanocita sejtek proliferációjára gyakorolt hatástát MTT teszttel vizsgáltuk a 0, 500, 1000 pg/ml-es koncentrációtartományban. A 12 órás mérési periódus végeztével a kolorimetriás kiértékeléssel 560 nm-en detektáltuk az eredményt, mely abszorbancia érték az élő sejtek számával volt arányos. A kiértékelésnél ANOVA analízist használtunk.

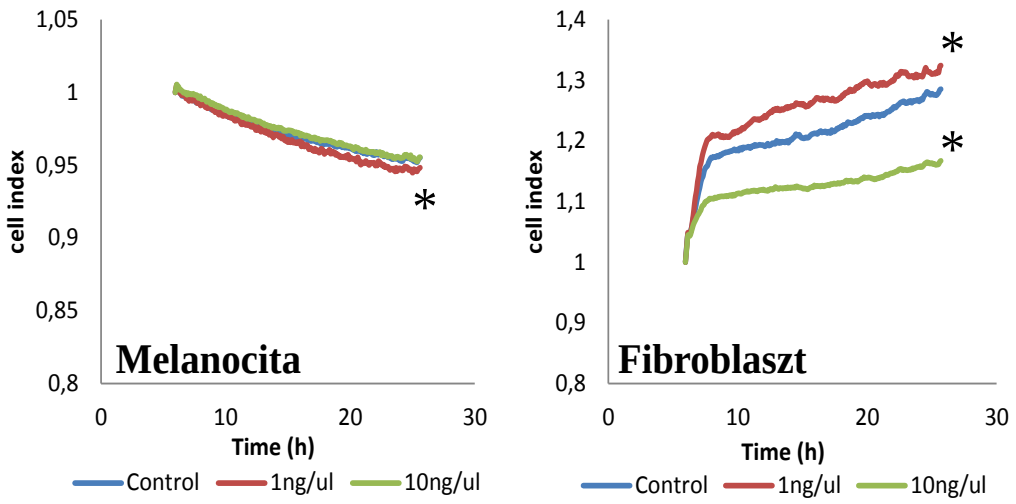
6.4. A CCL8 migrációra gyakorolt hatásának vizsgálata

A CCL8-nak az áttétképzés alapvetően fontos lépésére, a sejtek migrációs potenciáljára gyakorolt hatását az xCELLigence rendszerével (Roche) CIM (Cell Invasion Migration) plate-n (16 férőhelyes) szemikvantitatívan határoztuk meg. Az impedancia mikroelektródás meghatározásával történő mérés során kezeletlen kontroll tenyészet migrációs aktivitásához viszonyítottuk a kezelésnek alávetett (HT 168, WM 983A melanóma valamint fibroblaszt és melanocita) sejtek migrációját. A CCL8-al a tenyészetek kétféle formában kerültek kapcsolatba: egyik felállásban közvetlenül a tenyészethez adva, a második felállásban kemoattraktánsként alkalmazva. A kezelések mindkét esetben 1 és 10 ng/ml-es koncentrációkban történtek. A vizsgálat a mérés kezdete után 5 órával indult és a 18 órás időtartam alatt öt percenként történt adatgyűjtés. Az eredmények összefoglalása a 16. ábrába inzertált táblázatban található. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a CCL8 alapvetően más hatást gyakorol a tumorsejtekre direkt kezelés során, ahol gyakorlatilag gátolja a tumorsejtek migrációját, ezzel szemben kemoattraktánskét fokozza azt. A nem tumoros sejtek (fibroblaszt, melanocita) migrációját ezzel szemben kemoattraktánsként nem befolyásolja, esetleg gátolja (fibroblaszt alacsony koncentráció) (16. ábra).

Közvetlenül adott CCL8



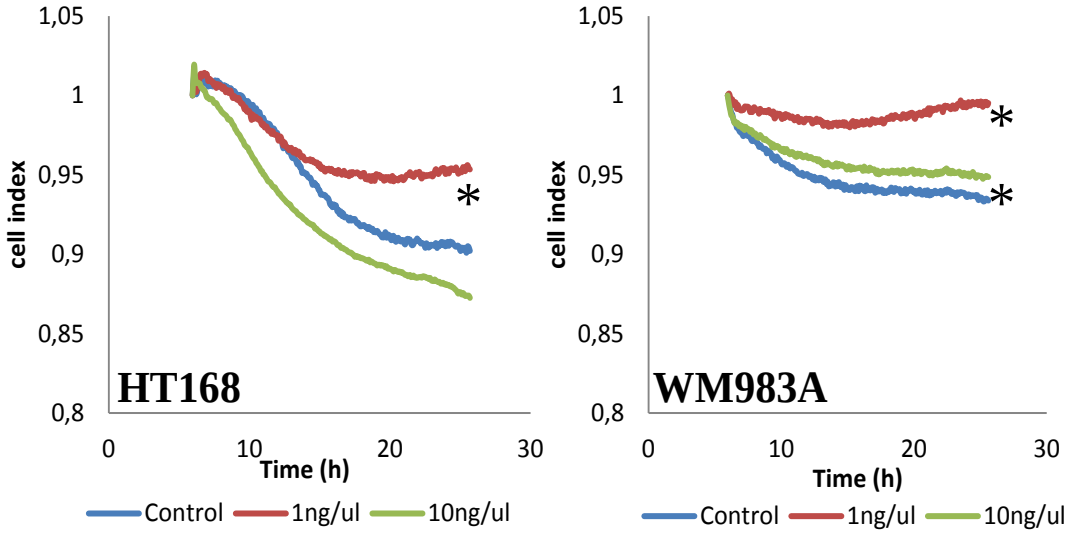
15. ábra A CCL8 hatását a sejtek migrációs potenciáljára

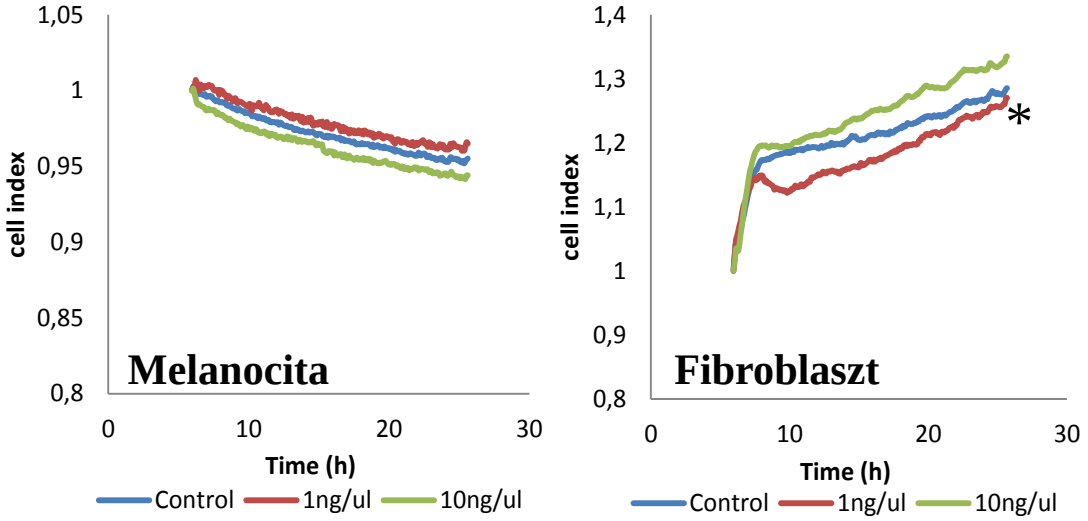


p<0,005

15. ábra A CCL8 hatását a sejtek migrációs potenciáljára az impedancia mikroelektródás mérésével vizsgáltuk. Két melanóma sejtvonal (HT168, WM983A), humán dermális fibroblaszt és humán melanocita kezeletlen kontroll tenyészetének migrációs aktivitásához viszonyítottuk ugyanezen sejtvonalak kezelésnek alávetett tenyészetei migrációs aktivitását. A kezelések 1 és 10 ng/ml-es koncentrációkban történtek közvetlenül a tenyészetekhez adva

Kemoattraktánsként adott CCL8





	HT168		WM 983A		FIBROBLAST		MELANOCYTE	
CCL8 koncentráció	1ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	10ng/ml
CCL8 közvetlenül	↓	↓	↓	-	↑	↓	↓	-
CCL8 kemoattraktánsként	↑	-	↑	↑	↓	-	-	-

↑ Kontrollhoz képest fokozott migráció ↓ Kontrollhoz képest csökkent migráció

16. ábra A CCL8 hatását a sejtek migrációs potenciáljára az impedancia mikroelektródás mérésével vizsgáltuk. Két melanóma sejtvonal (HT168, WM983A), humán dermális fibroblaszt és humán melanocita kezeletlen kontroll tenyészetének migrációs aktivitásához viszonyítottuk ugyanezen sejtvonalak kezelésnek alávetett tenyészetei migrációs aktivitását. A kezelések 1 és 10 ng/ml-es koncentrációkban történtek kemoattraktánsként a tenyészetekhez adva. A statisztikai kiértékelést ANOVA analízissel végeztük.

6.5. Host faktorként azonosított gének vizsgálata humán primer melanómákban

Párhuzamosan a CCL8 funkcionális vizsgálataival az előzetesen szelektált gének közül humán klinikai mintákon azok expresszióbeli különbségét vizsgáltuk, melyek a vizsgált sejtvonalak közül nem mutattak mindháromban azonos irányú változást, viszont a változás mértéke nagyobb volt, mint kétszeres, vagy a humán megfelelőjük is expresszálódott az implantált tumorokban, így klinikai mintákon nem volt egyértelmű a vizsgálat specificitása. Valósidejű PCR segítségével határoztuk meg ezen gének béta aktinhoz viszonyított relatív expresszióját a betegek két csoportjában. Az első csoportba a metasztatikus primer melanómákat (öt év követési idő során kialakult áttétek

megtalálhatóak voltak), míg a második csoportba a nem metasztatikus primer melanómákat (öt év követési idő után sem alakultak ki áttétek) soroltuk (17. ábra). A vizsgált gének tekintetében nem tudtunk kimutatni statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között.

Gén neve	Metasztatikus (n=21)		Nem Metasztatikus (n=15)		P
	Átlag	Std.Dev.	Átlag	Std.Dev.	
CTSL	2,08	1,96	2,63	2,52	0,47
DEAD BOX 60	3,28	5,99	2,15	4,26	0,53
FAM	35,9	59,1	23,79	52,25	0,52
PXMP	10,357	10,87	15,26	26,51	0,44
LASS5	5,25	7,62	8,8	8,24	0,19

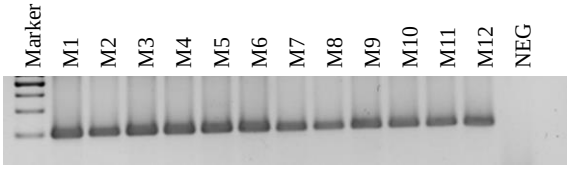
17. ábra Öt kiválasztott gén valósidejű PCR-al mért relatív expressziója metasztatikus és nem metasztatikus humán melanóma mintákban. Szignifikáns különbséget egyik esetben sem tudtunk kimutatni

6.6. CCL8 expresszió vizsgálata humán klinikai mintából származó primer melanómákban

Mivel már ismertük a CCL8 expressziós mintázatát az áttétképzést modellező állatkísérleti rendszereinkben valamint *in vitro* vizsgálataink előzetes információkkal szolgáltak a humán (nem tumoros és melanóma) sejtvonalak expressziós és biológiai viselkedési sajátságairól is, elérkezettnek láttuk az időt, hogy humán klinikai mintákon ellenőrizzük van-e valamilyen összefüggés a CCL8 és a humán melanómák áttétképzése között.

Ennek megítélésére a CCL8 kifejeződését vizsgáltuk humán műtéti mintákban. A vizsgálat során metasztázisokat nem vizsgáltunk, kizárólag a primer tumorokat, azonban a felosztások alapját a megjelenő szervi áttétek megjelenése ill. lokalizációja adta. A mintákat két csoportra osztottuk: nem metasztatikus primer melanóma (NM - öt év követési idő során a betegnél áttétek kialakulását nem tapasztaltuk) ill. metasztatikus primer melanóma (M – a betegben öt éven belül áttétek alakultak ki). Mindkét csoportban a nem, életkor, pigmentáltság, Clark féle inváziós mélység és Breslow féle

tumorvastagsági értékek eloszlása egyenletes és a két csoport között nem mutatott lényegi eltérést (19. ábra). A metasztatikus betegcsoportban a tüdőben, májban, nyirokcsomókban, csontban, agyban és a bőrben lokalizálódtak az áttétek (20. ábra). A mintákból total RNS izolálását követően meghatároztuk a CCL8 expresszióját, mely a kvalitatív elemzés tanúsága szerint minden mintában kimutatható volt (18. ábra).



18. ábra A klinikai mintákból RNS izolálást követően kvantitatívan meghatároztuk a CCL8 relatív mennyiségét. A kvantitálás alapjául szolgáló PCR termék autentikus voltáról olvadáspont analízissel és agaróz gélen történő futtatással is megbizonyosodtunk

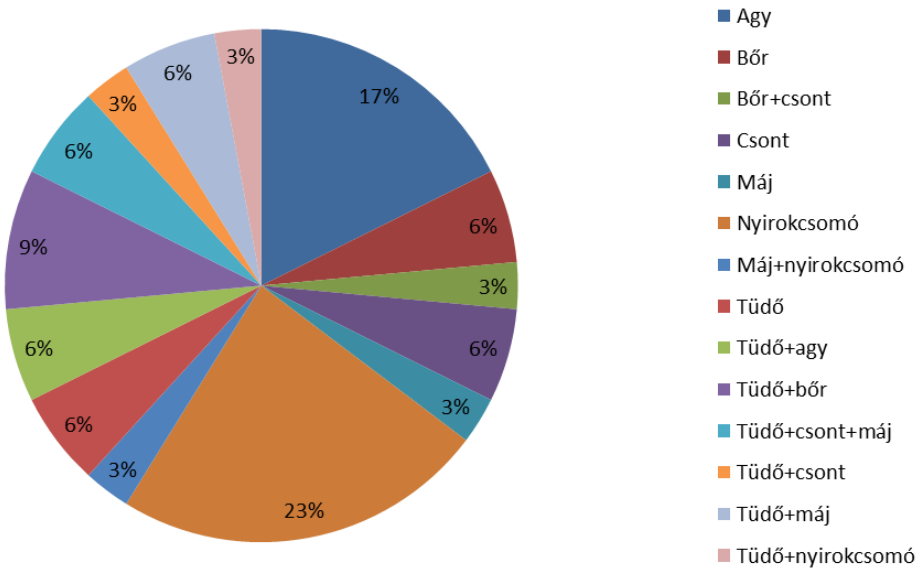
Ezt követően ugyanezen minták kvantitatív analízise során meghatároztuk a β-aktinhoz viszonyított relatív expressziós szinteket. A csoportok közti különbség szignifikáns voltát t-teszttel vizsgáltuk. 54 minta vizsgálata során a metasztatikus és nem metasztatikus relációban nem találtunk szignifikáns különbséget. A metasztatikus csoporton belül az egyes lokalizációk értékeit külön-külön összevetve a nem metasztatikus mintákban mért expressziós szinttel azonban lényeges változásra találtunk. Nevezetesen míg a máj, agy, csont, nyirokcsomó és bőr áttéteket hordozó betegek primer tumorában nem találtunk szignifikáns CCL8 expresszióbeli eltérést az áttétet nem képező betegekkel szemben. A tüdőáttétes betegek primer tumora azonban szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszálta a CCL8-at mint a nem metasztatikus betegeké (22/a ábra). A metasztatikus csoporton belül a tüdő vs. máj (22/c ábra) ill. a nyirokcsomó vs. csont metasztázist adó primer tumorok (22/e ábra) CCL8 expressziója között detektáltunk szignifikáns különbséget. Ugyanezen klinikai mintákon kvantitatívan, valósidejű PCR segítségével meghatároztuk a CCL8 receptora a CCR1 expressziós szintjét (22. ábra). Jóllehet a gén minden mintában expresszálódott, annak mértékében az egyes csoportok között nem találtunk különbséget. Mivel a humán klinikai minták esetén nem volt módunk a strómális komponensek CCL8 expresszióját

mRNS szinten külön vizsgálni, annak fehérje szintű megjelenését immunhisztokémiai vizsgálattal lokalizáltuk. A CCL8 expresszáló sejtek elszórtan a strómára lokalizáltan és a tumorban foltszerűen egyaránt megjelentek (21. ábra).

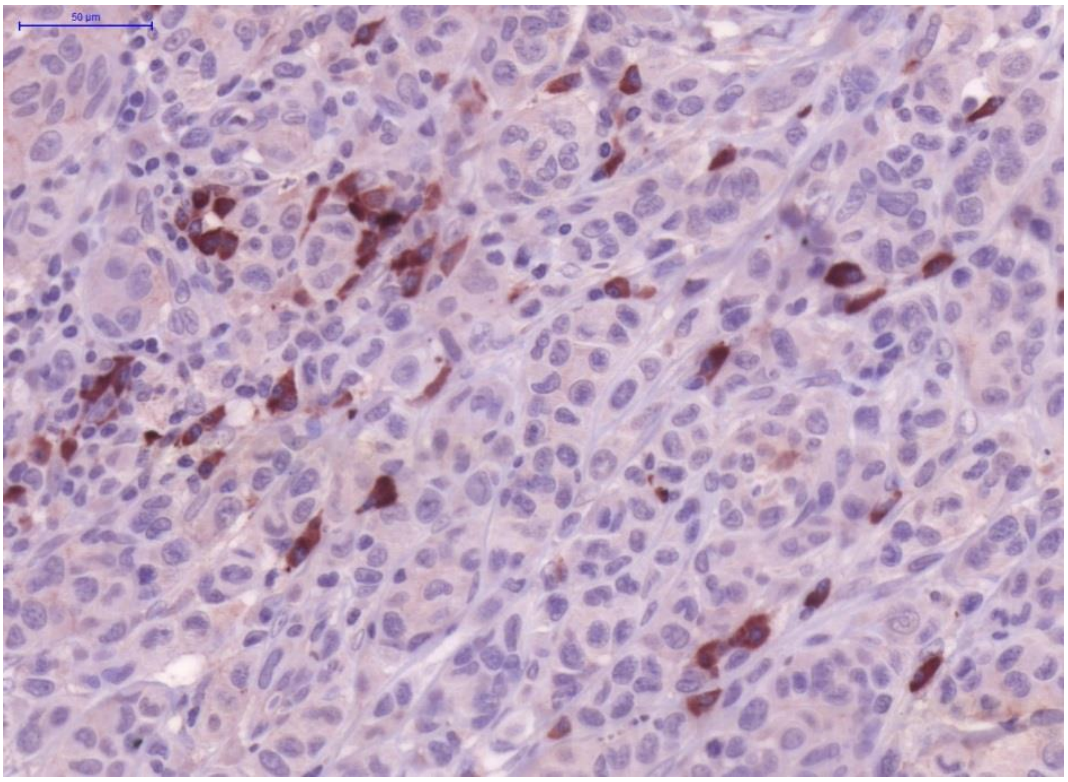
A lokális CCL8 jelenlétén kívül vizsgáltuk a szisztémás megjelenését is melanómás betegek szérumában. A betegeket a szervi metasztázisok megléte (M) illetve a metasztázis megjelenésének hiánya (NM) alapján két csoportba soroltuk. A CCL8 koncentrációját ELISA kittel határoztuk meg. A standard görbe felállításához rekombináns CCL8-at használtunk. 36 beteg szérum mintáját megvizsgálva (17 távoli metasztázissal rendelkező és 19 nem metasztatikus minta) 15 esetben detektáltunk 60 pg/ml-es értéknél nagyobb CCL8 koncentrációt a betegek szérumában. Szignifikáns különbség statisztikai módszerekkel nem volt kimutathat, azonban az ábrán látszik az emelkedett kemokinszint a nem metasztatikus páciensek esetében (22/g ábra).

	Nem metasztatikus primer melanóma *n* (%)	Metasztatikus primer melanóma	
		Tüdő *n* (%)	Összes metasztatikus *n* (%)
Kor			
Medián (év)	**52**	55	**62**
Nem			
Férfi	**11(46)**	7(54)	**17(52)**
Nő	**13(54)**	6(46)	**16(48)**
Pigmentáció			
Amelanotic	**10(41)**	7(53)	**15(45.5)**
Közepesen pigmentált	**11(47)**	5(38)	**15(45.5)**
Erősen pigmentált	**3(11)**	1(7)	**3(9)**
Lokalizáció			
Fej/Nyak	**1(4)**	1(7)	**2(6)**
Törzs	**16(66)**	10(76)	**22(66)**
Végtagok proximális része	**3(12)**	2(15)	**3(9)**
Végtagok disztális része	**4(16)**	0(0)	**6(18)**
Klinikai megjelenés			
Superficial spreading	**14(59)**	6(46)	**18(54.5)**
Nodular	**10(41)**	7(53)	**14(42.5)**
Egyéb	**0(0)**	0(0)	**1(3)**
Breslow féle tumorvastagság (mm)			
<1.01	**0(0)**	0(0)	**1(3)**
1.01–2.00	**9(37.5)**	5(38)	**8(24)**
2.01–4.00	**9(37.5)**	2(15)	**10(30)**
>4.00 0	**6(23)**	6(46)	**14(33)**
Clark féle inváziós mélység			
I	**0(0)**	0(0)	**0(0)**
II	**1(4)**	0(0)	**1(3)**
III	**8(33)**	4(30)	**8(24)**
IV	**15(63)**	8(61)	**21(64)**
V	**0(0)**	1(7)	**3(9)**

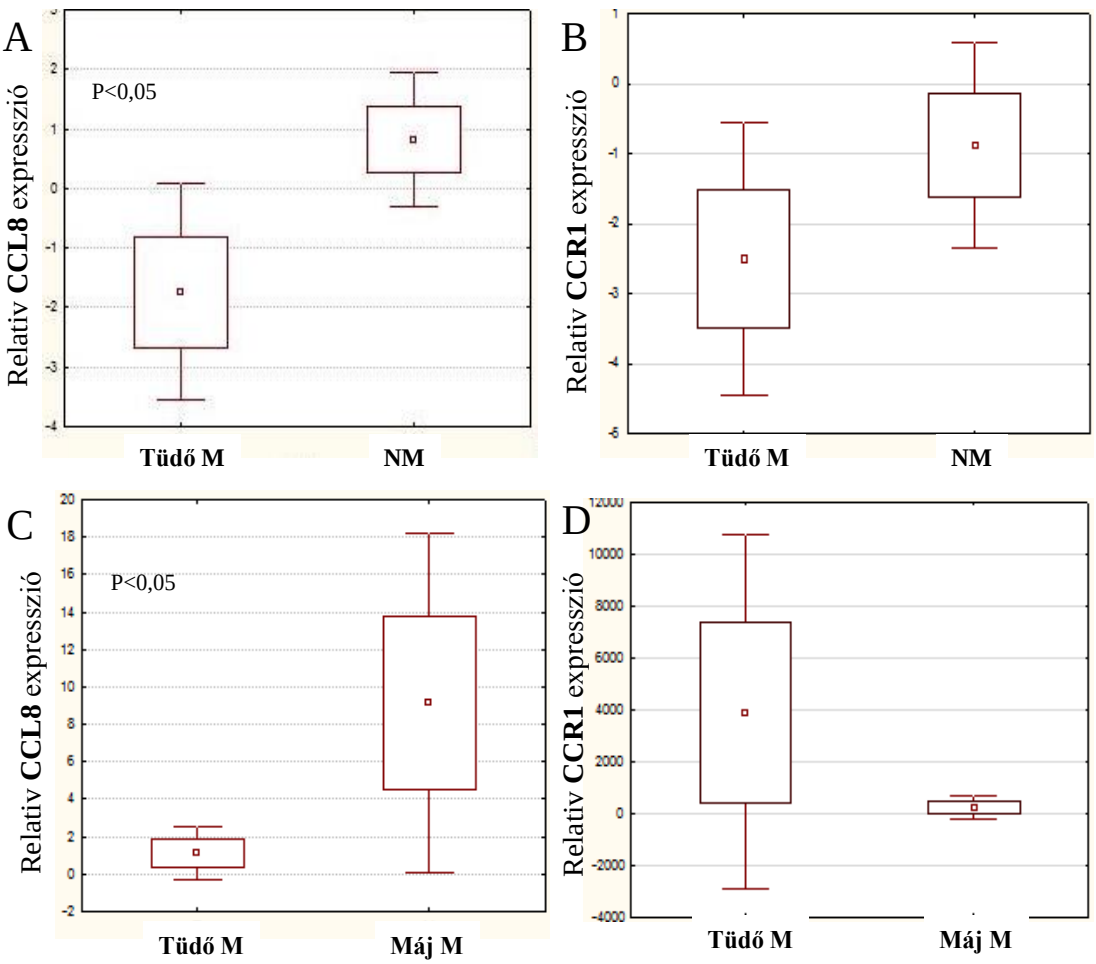
19. ábra A vizsgálatban szereplő melanómás betegek kor és nemek szerinti megoszlása valamint a primer melanómák klinikai paraméterei (pigmentáltság, lokalizáció, klinikai megjelenés, Breslow féle tumorvastagság és Clark féle inváziós mélység).



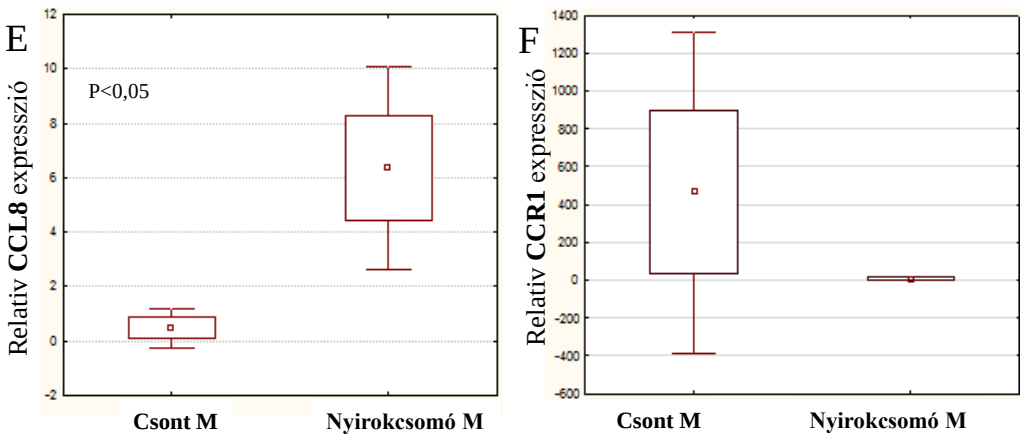
20.ábra A vizsgálatban szereplő primer melanómák áttéteinek lokalizációja (egyes ill. multiplex) és az egyes lokalizációk előfordulási gyakorisága.



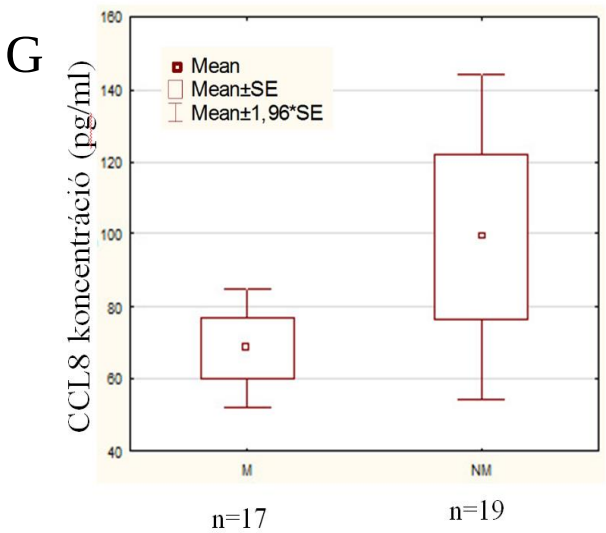
21. ábra A CCL8 fehérje immunhisztokémiai reakcióval történő kimutatása humán primer melanómában. Jellegzetes, foltokban kifejeződő megjelenése jól látható a felvételen (20x nagyítás). A reakció a melanin eliminálása után készült.



22. ábra A CCL8 és CCR1 β-aktinhoz viszonyított relatív expressziója humán műtéti primer melanóma mintákban. A csoportok közti különbség szignifikáns voltát t-teszttel vizsgáltuk. Az **A diagramon** a nem metasztatizáló (NM) és tüdőáttétet adó primer melanómák (Tüdő M) CCL8 expressziója és **B diagramon** azok CCR1expressziója látható. A **C diagramon** a metasztatikus csoporton belül a tüdőáttétet (Tüdő M) és a májáttétet (Máj M) adó primer tumorok CCL8 és **D diagramon** ugyanezen minták CCR1 expresszióját ábrázoltuk. A CCR1 expressziójának szintjében egyik esetben sem találtunk eltérést a két csoport között. Ezzel szemben a CCL8 expressziós értékei között szignifikáns különbséget detektáltunk. A nyirokcsomó/csontáttét valamint tüdő/májáttét relatív expressziós szintek összehasonlítása a csoportok alacsony elemszáma miatt csak a tájékozódást szolgálja.



A metasztatikus csoporton belül a nyirokcsomó (Nyirokcsomó M) és a csontáttétet (Csont M) (**E** és **F** ábra) adó primer tumorok CCL8 és CCR1 expressziója látható. A CCR1 expressziójának szintjében egyik esetben sem találtunk eltérést a két csoport között. Ezzel szemben a bemutatott csoportok CCL8 expressziós értékei között szignifikáns különbséget detektáltunk. A nyirokcsomó/csontáttét valamint tüdő/májáttét relatív expressziós szintek összehasonlítása a csoportok alacsony elemszáma miatt ebben az esetben is csak csak a tájékozódást szolgálja.



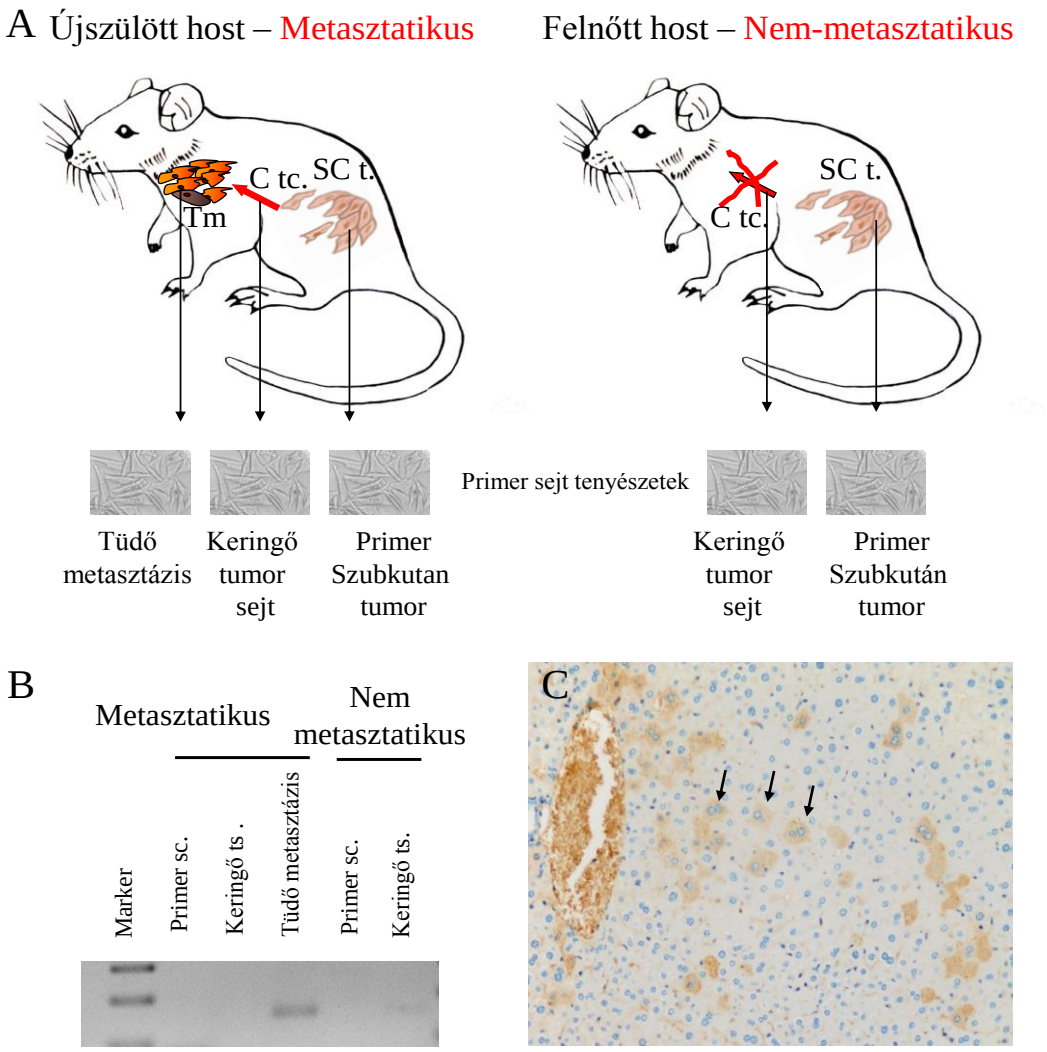
22. ábra (G) Az szisztémásan szérumban megjelenő CCL8 mennyiségét ELISA tesztel határoztuk meg 36 nem metasztatizáló (NM) és metasztázisokkal rendelkező (M) betegek esetében. A két csoport közötti statisztikai különbség az adatok nagyfokú szóródása miatt nem volt kimutatható.

6.7. CCL8 expresszió vizsgálata melanóma progressziója során kísérletes állatmodellben

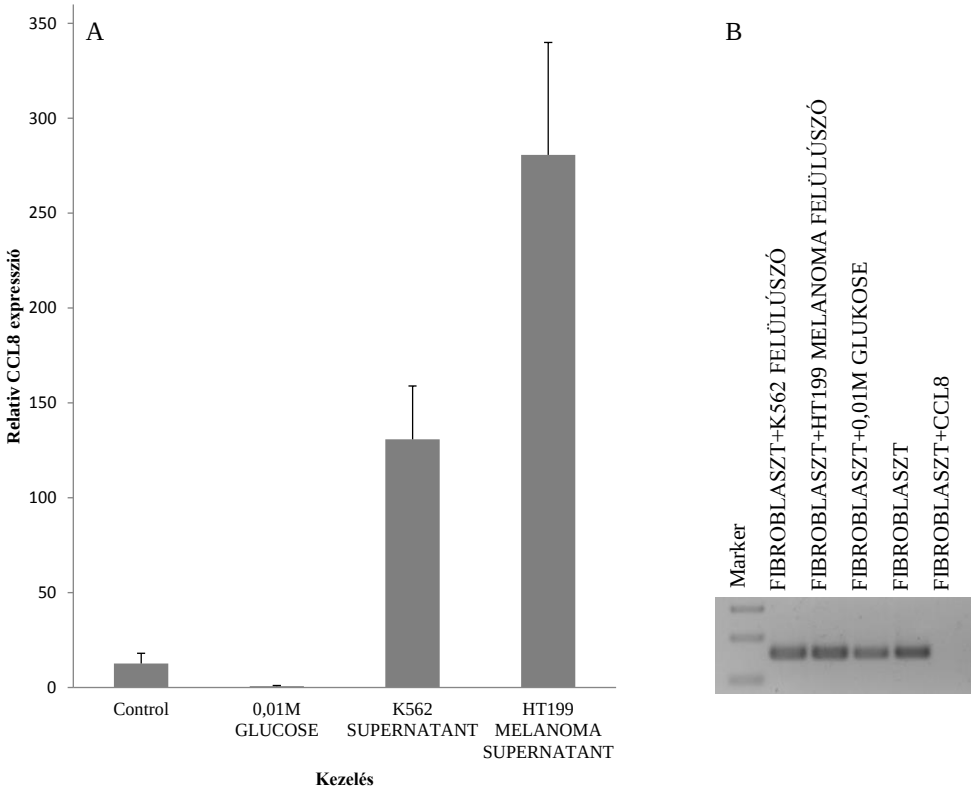
Kísérletes állatmodellünk lehetőséget nyújtott arra, hogy az áttétképzés különböző lépéseiből származó tumorsejtpopulációkat tisztán, strómális komponensektől mentesen vizsgálhassunk (23/a ábra). Nevezetesen primer tenyészeteket hoztunk létre nem áttétképző primer humán melanómából és az ugyanazon állatból származó keringő tumorsejtekből, áttétképző primer humán melanómából és az ugyanazon állatból származó keringő tumorsejtből és tüdőáttétekből. Mindezen mintában kvanlitatívan mértük a CCL8 expresszióját. A metasztatikus modellrendszerből származó tumorsejtvonal tenyészetek közül az áttétben, míg a nem metasztatikus rendszerben a keringésből izolált sejteken tudtunk kimutatni CCL8 expressziót, a többi tenyészetben jelenlétét mRNS szintjén nem detektáltuk (23/b ábra). A metasztatikus primer tumorban immunhisztokémiai reakcióval kimutattunk CCL8 termelő tumorsejteket, azonban ezek meglehetősen alacsony számban fordultak elő és az esetek jelentős hányadában kisebb csoportokat képeztek (23/c ábra).

6.8. Tumor-host kölcsönhatás *in vitro* szimulációja

A host és a tumor közötti molekuláris kooperáció további lehetőségeit vizsgálva HT199 melanóma valamint K562 leukémia sejtvonalak felülúszóival kezeltünk dermális fibroblaszt tenyészeteket. Kontrollként kezeletlen sejteket valamint glükóz oldatot használtunk. A konfluens tumorsejt tenyészetek felülúszóinak hatására a CCL8 relatív expressziójának drámai növekedését tapasztaltuk a humán fibroblasztokban. Ezzel szemben önmagában CCL8-at adva a fibroblaszt tenyészetekhez az a konstans CCL8 expressziót megszüntette (24. ábra).



23.ábra CCL8 expresszió vizsgálata melanóma progressziója során kísérletes állatmodellben (A) Humán melanóma szemiortotopikus implantációját követően az újszülött egerekben kialakulnak tüdőmetasztázisok, míg a felnőtt állatokban soha nem találtunk áttéteket. (**B)** A primer szubkután tumorokból, vérben keringő tumorsejtekből és a tüdőmetasztázisokból primer tenyészeteket hoztunk létre, ezáltal a tumorsejtek expressziós mintázata strómális alkotók nélkül vált vizsgálhatóvá. A sejttenyészetekből RNS izolálást követő RT-PCR után CCL8 expressziót csak a tüdőmetasztázis és keringő tumorsejtek esetén tudtunk kimutatni **C** CCL8 pozitív sejtek kimutatása szubkután metasztatikus primer tumorban immunhisztokémia segítségével. Az ábrán jól látható a foltokba megjelenő pozitív sejtek kis csoportja



24. ábra A host-tumor kapcsolat szimulációja Humán dermális fibroblaszt sejteket HT199 melanóma és K562 leukémia tumortenyészetek sejtmentes felülúszójával valamint rekombináns humán CCL8-al kezeltünk. Az egyik kezeletlen kontroll csoportot 0,01M glükóz oldatot kapott, majd RNS izolálást követően az expresszált CCL 8 menyiségét valós idejű PCR–es mérésekkel határoztuk meg. (A) A tumorsejt felülúszók hatására a dermális fibroblasztok CCL8 expressziója megnőtt, míg a tiszta CCL8 adása az expressziót leszabályozta(B).

6.9. Dermális fibroblasztok CCL8 specifikus miRNS mintázatának meghatározása

A környezetben jelenlévő kemokin millieu (növekvő ill. csökkenő CCL8 szint) változása a dermális fibroblasztokban gyorsan lezajló folyamatokat indított el, melynek nyomonkövetésére CCl8 kezelés, valamint kezelés nélküli sejtek miRNS pool változását vettük górcső alá. Összesen 800 humán miRNS mennyiségének változását mértük meg a kezelés hatására. Kizárólag az ötszörösnél nagyobb expressziós különbségeket mutató miRNS-eket figyelembe véve meghatároztunk egy, a CCL8

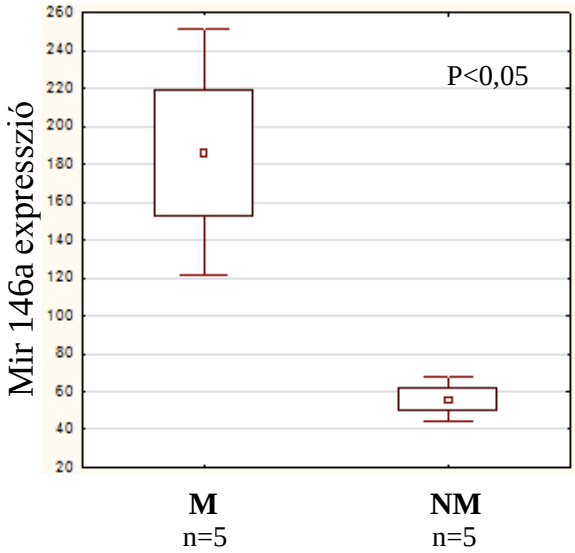
kezelés hatására a dermális fibroblasztokban létrejövő kemokin specifikus miRNS mintázatot (25. ábra).

SZEKVENCIA ID	ACCESSION NUMBER	FIBROBLASZT	FIBROBLASZT+10 ng/mlCCL8	VÁLTOZÁS	
hsa-miR-367	MIMAT0000719	61,94	1,73	**0,03**	Változás mértéke >10x
hsa-miR-1245	MIMAT0005897	46,45	1,73	**0,04**	
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	67,1	3,46	**0,05**	
hsa-miR-628-5p	MIMAT0004809	51,62	3,46	**0,07**	
hsa-miR-2277	MIMAT0011777	25,81	1,73	**0,07**	
hsa-miR-523	MIMAT0002840	25,81	1,73	**0,07**	
hsa-miR-545	MIMAT0003165	165,17	13,83	**0,08**	
hsa-miR-1269	MIMAT0005923	98,07	10,37	**0,11**	Változás mértéke 5-10x
hsa-miR-429	MIMAT0001536	108,39	13,83	**0,13**	
hsa-miR-539	MIMAT0003163	299,37	48,41	**0,16**	
hsa-miR-1225-3p	MIMAT0005573	61,94	10,37	**0,17**	
hsa-miR-1276	MIMAT0005930	61,94	10,37	**0,17**	
hsa-miR-525-3p	MIMAT0002839	61,94	10,37	**0,17**	
hsa-miR-1277	MIMAT0005933	129,04	22,48	**0,17**	
hsa-miR-517c+519a	MIMAT0002866	247,75	43,22	**0,17**	
hsa-miR-1287	MIMAT0005878	108,39	19,02	**0,18**	
hsa-miR-146a	MIMAT0000449	154,85	27,66	**0,18**	
hsa-miR-19a	MIMAT0000073	67,1	12,1	**0,18**	
hsa-miR-556-5p	MIMAT0003220	67,1	12,1	**0,18**	
hsa-miR-9	MIMAT0000441	67,1	12,1	**0,18**	
hsa-miR-2110	MIMAT0010133	56,78	10,37	**0,18**	
hsa-miR-595	MIMAT0003263	56,78	10,37	**0,18**	
hsa-miR-1253	MIMAT0005904	113,55	20,75	**0,18**	
hsa-miR-215	MIMAT0000272	113,55	20,75	**0,18**	
hsa-miR-1978	MIMAT0009453	82,58	15,56	**0,19**	
hsa-miR-632	MIMAT0003302	72,26	13,83	**0,19**	
hsa-miR-548b-3p	MIMAT0003254	221,95	43,22	**0,19**	
hsa-miR-1263	MIMAT0005915	61,94	12,1	**0,20**	
hsa-miR-107	MIMAT0000104	87,75	17,29	**0,20**	
hsa-miR-553	MIMAT0003216	87,75	17,29	**0,20**	
hsa-miR-646	MIMAT0003316	175,49	34,58	**0,20**	
hsa-miR-548h	MIMAT0005928	165,17	32,85	**0,20**	
hsa-miR-22	MIMAT0000077	51,62	259,35	**5,02**	
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	407,76	2131,85	**5,23**	
hsa-miR-423-3p	MIMAT0001340	15,48	86,45	**5,58**	
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	36,13	202,29	**5,60**	
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	82,58	468,56	**5,67**	
hsa-miR-199a/199b-3p	MIMAT0000232	56,78	363,09	**6,39**	
hsa-miR-424	MIMAT0001341	20,65	138,32	**6,70**	
hsa-let-7b	MIMAT0000063	92,91	632,81	**6,81**	
hsa-let-7a	MIMAT0000062	82,58	650,1	**7,87**	
hsa-miR-29a	MIMAT0000086	56,78	641,46	**11,30**	Változás mértéke >10x
hsa-miR-579	MIMAT0003244	5,16	134,86	**26,14**	
hsa-miR-26a	MIMAT0000082	5,16	188,46	**36,52**	

25.ábra Dermális fibroblasztok CCL8 specifikus miRNS mintázata Dermális fibroblasztokat rekombináns CCL8-al kezeltünk, majd meghatároztuk a kezelésre hatására expresszálódó miRNS mintázatot. A mennyiségi értékek a nanoString technika következtében abszolút mérőszámként jelentek meg. A 800 vizsgált miRNS közül a válogatás azokat a miRNS-eket tartalmazza, amelyeknél a változás mértéke a kezeletlen kontrollhoz képest legalább ötszörös eltérést (növekedést vagy csökkenést) mutatott.

6.10. A miR146a expressziója primer humán melanómákban

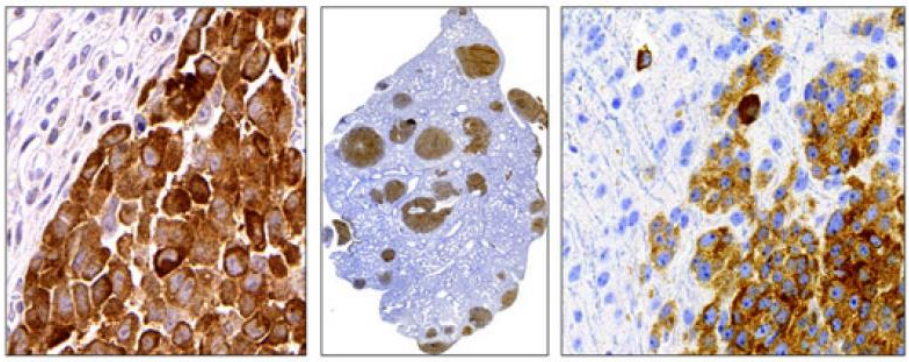
A lista „középmezőnyében” szereplő miR146a irodalmi adatok szerint ismerten szerepet játszik a CCL8 expressziójának szabályozásában. A humán klinikai mintapopulációból random módon 5 metasztatikus és 5 nem metasztatikus primer tumort kiválasztva, azokban megmértük a miR146a expresszióját. A miR146a változása metasztatikus és nem metasztatikus (az áttét lokalizációjától független) primer melanómák esetében statisztikailag elkülönült, s a metasztatikus esetben magasabb expressziós szintet mutattak mint a nem metasztatikus esetben (26.ábra).



26.ábra miR146a expresszió humán primer melanómákban Véletlenszerüen kiválasztott 5 metasztatizáló (lokalizációtól független) és 5 nem metasztaizáló primer melanóma nanoString technológiával meghatározott miR146a expressziója között szignifikáns eltérést tapasztaltunk. A grafikonon az átlag látható ± SE

6.11. Kollagén XVII expresszió vizsgálata humán melanóma progressziója során kísérletes állatmodellben

HT199 humán melanóma sejteket oltottunk szubkután újszülött scid egerekbe. A kísérlet terminálását követően a szubkután primer tumorból és a tüdő valamint agyi áttétekből metszeteket készítettünk, és meghatároztuk a kollgén XVII protein expresszióját. A felvételeken jól látható, hogy a tumorsejtek a primer tumorban és a szervi áttétekben is nagymértékben kifejezik a kollagén XVII-et.



27.ábra Kollagén XVII protein expressziója HT199 tumor scid egérbe történő implantációját kövtően a kollagén XVII epressziót a szubkután primer tumorban és a tüdő valamint agyi áttétekben is kimutattuk.

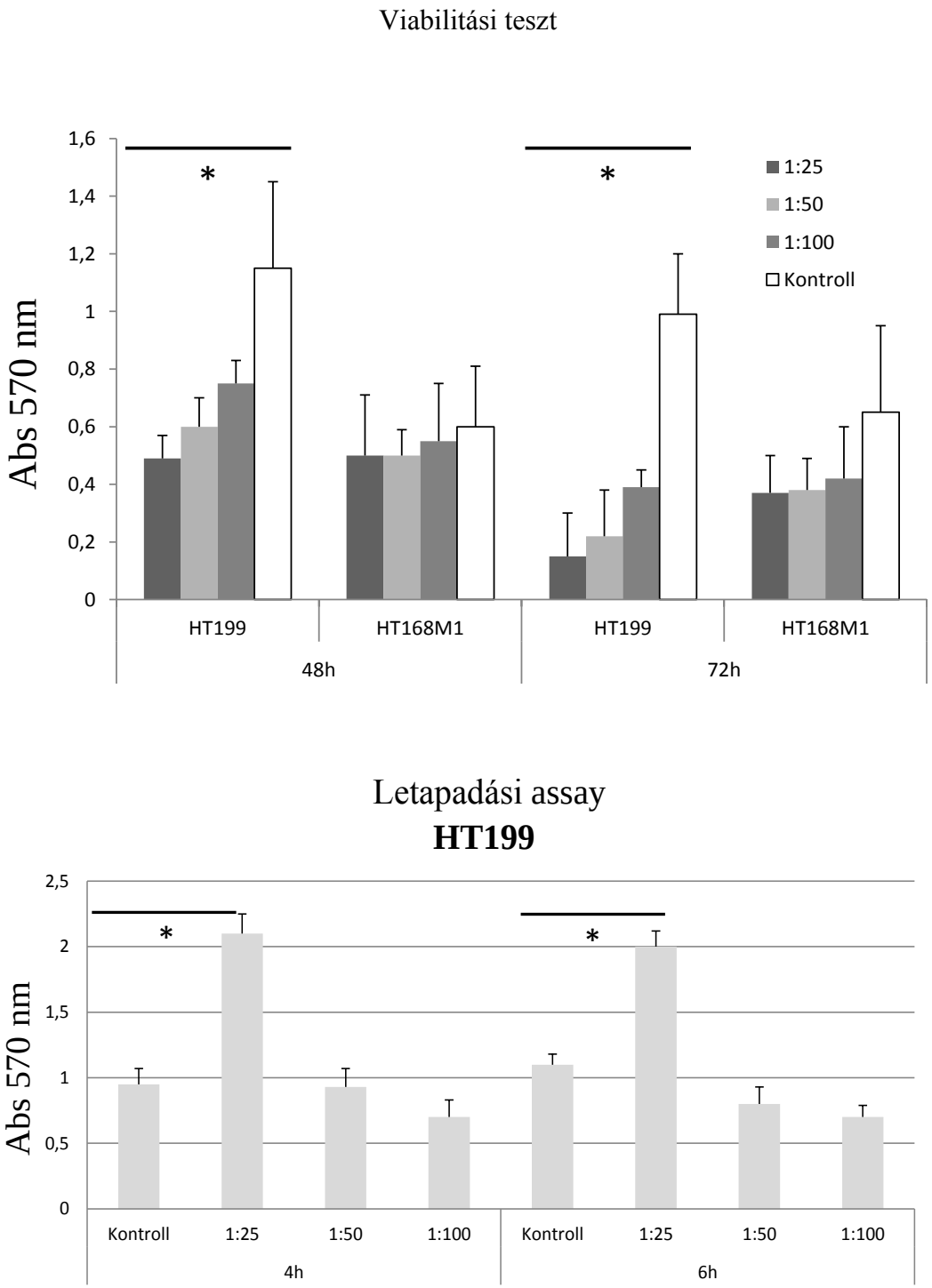
Humán melanóma *scid* egérbe történt implantációját követően a kialakult primer tumorban, tüdőmetasztázisokban, valamint az agyi áttétekben egyaránt sikerült kimutatni a kollagén XVII jelenlétét immunhisztokémiai reakcióval (27. ábra).

Annak eldöntésére, hogy ez az expresszió a tumorsejtek egyedi tulajdonsága, vagy a szöveti mikrokörnyezet indukciós hatásának tulajdonítható az említett tumorokból létrehozott primer tenyészeteken is elvégeztük az immunreakciókat. Ez egyértelműen igazolta, hogy a tumorsejtek strómális stimuláció nélkül is expresszálják a kollagén XVII-et.

6.12. A kollagén XVII proliferációra, letapadásra, apoptózisra gyakorolt hatásának vizsgálata:

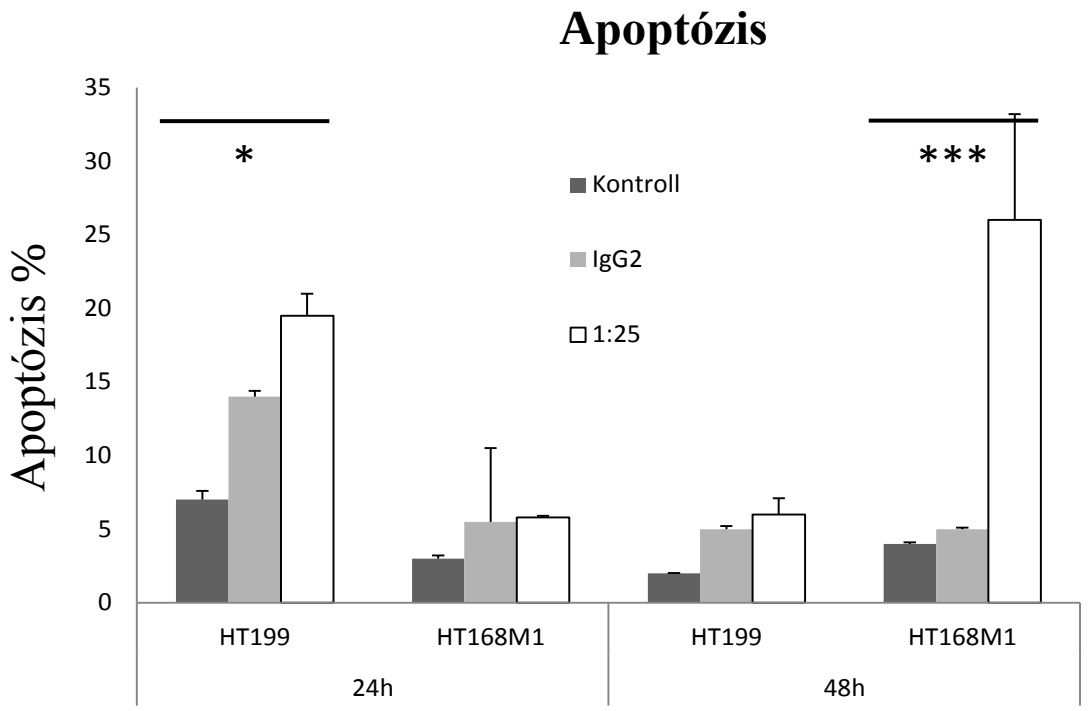
A melanóma sejtek (HT199 és HT168M1) proliferációs vizsgálata IgG2b kontroll alkalmazása mellett történt 1:25, 1:50 és 1:100 arányú hígításban alkalmazva a

0,25mg/ml-es koncentrációjú 9G2 antitestet, mely a kollagén XVII extracelluláris régióját ismeri fel. A kezelés kiértékelésére 48 valamint 72 órát követően került sor. Szignifikáns különbséget a HT199 esetében mértünk a 25x-ös hígítás alkalmazása mellett (28. ábra).



28.ábra A kollagén XVII elleni antitesttel történő kezelés hatása humán melanóma sejtek viabilitására, valamint aljzatra történő kitapadásukra. (*p<0.05)

Ugyanezen kezelésnek a sejtek letapadására gyakorolt hatását SRB teszttel vizsgáltuk négy és hat órás időintervallumban HT199 sejteken. Hatást itt is csak a 25x-ös higítás mellett volt megfigyelhető. A HT199 és HT168M1 humán melanóma sejtvonalakon megvizsgáltuk a 9G2 antitest apoptózis indukáló hatását is. A sejtek kitapadása után a szubkonfluens tenyészeteket 24 és 48 órán keresztül kezeltük a kollagén XVII extracelluláris régióját felismerő antitesttel. Az eredményeket propídium jodidos festést követően áramlási citometriával vizsgáltuk és az apoptózis mértékét az összsejtszám százalékában adtuk meg (29. ábra).



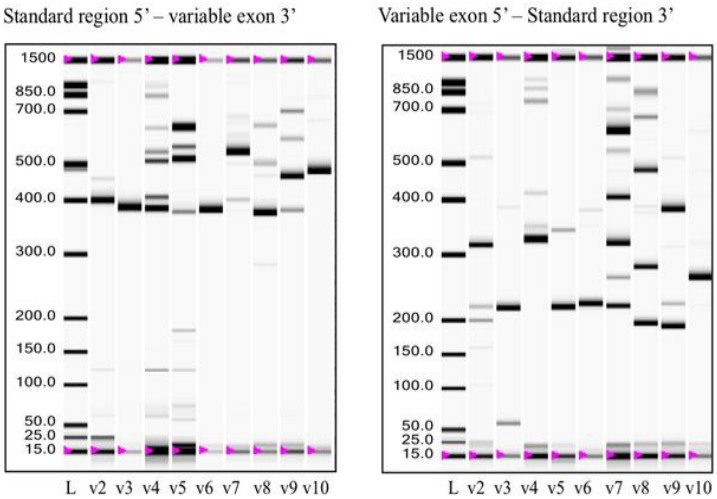
29.ábra A kollagén XVII elleni antitesttel történő kezelés hatása humán melanóma sejtek apoptotikus képességére HT199 és HT168M1 melanóma sejteket *in vitro* anti kollagén XVII antitesttel kezeltünk, és ezt követően áramlási citometriás mérésekkel meghatároztuk a sejtek apoptotikus státuszát

6.13. A CD44 melanómára jellemző splice variáns mintázata

Az tumorsejt-mátrix kapcsolat szintjének jelentős szereplője a CD44 molekulacsalád, melyek kifejeződését illetve variabilitásuk meghatározását humán melanóma sejtvonalakon is elvégeztük. Alternatív splicing révén a CD44 génről számos proteint kódoló variáns képződhet, melyek szerkezetükben és funkciójukban is eltérhetnek egymástól. A képződő variánsok térben és időben nem különülnek el egymástól, így adott vizsgálat során az összes expresszált izoforma megjelenik a molekuláris mintázatban, ami nagyban megnehezíti a korrekt teljes splice-mintázat (ASP) meghatározását. Az első lépésben a 10 variábilis exont egyszerre közrefogó, standard régióra helyezett primerekkel kapott PCR termékeket t-vektorba klónoztuk, majd direkt szekvenálással azonosítottuk az így kapott izoformákat. Az eredmény azonban lényegesen szegényesebb képet mutatott, mint amit akár irodalmi adatok alapján is láttunk. Ezért második lépésben a variábilis exonokra tervezett öt primer-párral fedtük le a vizsgálni kívánt régiót. Ez a módszer lehetőséget adott egy úgynevezett alternatív splicing fingerprint megalkotására. Az öt primerpárral kapott PCR-termékeket mindig azonos sorrendben egymás mellett futtatva ez a „virtuális eszköz" lehetőséget biztosított arra, hogy igazoljuk, hogy a különböző genetikai eredetű humán melanómák CD44 alternatív splicing fingerprintje megegyezik egymással és annak szerkezete a tumor progressziója során sem változik. Kvantitatív méréseket végezve az egyes variábilis exonokra tervezett primerekkel, azonban jelezte, hogy ha kvalitatív változások nem is, de kvantitatív változások egyértelműen kimutathatók a progresszió során. Az exonális szerkezet felderítésére tervezett sorozat PCR reakciók termékét gélelektroforézissel egymástól elválasztva azok egyenként tovább vizsgálhatóvá váltak. Az így keletkezett PCR termék fragmentumokat direkt szekvenálással vizsgáltuk, amely értelemszerűen csak molekularészletek validálására nyújtott lehetőséget A gélelektroforézis gyenge felbontása (nem is beszélve a közel azonos méretű exonok okán nem elkülöníthető variánsokról) miatt ezen típusú kutatásban nagy lehetőségnek ígérkezett a molekulák egyedi detektálására alkalmas újgenerációs szekvenálás. Ezzel a metodikával, kiegészítve a „fishing" technikával az átfedő régiók alapján meg tudtuk alkotni a humán melanómák CD44 alternatív splice variánsainak lajstromát (30. ábra).

A

B



30.ábra CD44 variánsok melanómában (A) A képen a melanómában (HT168 sejtvonal-ban) megtalálható CD44 izoformák sematikus ábrázolása látható. A variábilis exonokat V betűvel jelöltük. Az ábrázolt izoformák sanger és újgenerációs szekvenálással is validnak bizonyultak. **(B)** A variábilis exonok két végére tervezett primerekkel végzett PCR reakció erdményét nagy felbontású mikrofluid alapú detekciós rendszerrel is megvizsgáltuk.

7. Megbeszélés

A mikrokörnyezet a daganatok viselkedésének egyik meghatározó szereplője. Részt vehet a kisebb daganatok elpusztításában, de bizonyos alkotói esetenként támogathatják is a daganat növekedését és migrációját [55,56]. E két hatás eredője gyakorlatilag egy olyan szelekciós nyomás, amely egy, a host számára elfogadható sajátságos tumorsejt populációt generál. A mikrokörnyezet, mint hatások összessége meglehetősen összetett és szövet/lokalizáció-specifikus. Vizsgálata nagy kihívást jelent több szempontból is. A host-tumor kölcsönhatáson kívül valószínűleg a host-host kölcsönhatásokkal is számolnunk kell. Értelemszerűen e komplexitás miatt az *in vitro* vizsgálatok kizárhatók, vagy optimális esetben *in vivo* jól definiált megfigyelések eredményeinek igazolására használhatók. *In vivo* a host eredetű faktorok elkülönítése megnyugtatóan csak *in situ* vizsgálatok esetén lehetséges. Technikai okokból azonban ezek a módszerek sokkal inkább a nagyobb (esetleg teljes genomra kiterjedő) számú molekulát párhuzamosan vizsgálni képes RNS-szintű munkák validálására szolgálnak.

A humán tumorok viselkedését vizsgáló xenotranszplantációs állatkísérletes modellek legnagyobb előnye, hogy nagymértékben képesek csökkenteni azoknak a változóknak a számát, amelyek megnehezítik a daganatok működésének a vizsgálatát. A génexpressziós vizsgálatok eredményeit a host genetikai és élettani háttere, a daganat kialakulásának háttere és a tumor lokalizációja oly mértékben befolyásolhatja, hogy az akár el is fedheti a tumorspecifikus sajátságokat. Az inbred, veleszületetten immunhiányos állatokon tenyészetben fenntartott tumorsejtekkel végzett kísérletek ezeket a változókat kiszűrik. A host minden párhuzamos esetben genetikailag azonosnak tekinthető, éppúgy az életkor, táplálkozási és életkörülmények. A daganat (heterogenitása ellenére) azonos genetikai változások eredménye és az implantációja azonos lokalizációba történik (= azonos mikrokörnyezetbe kerül). Az egyik legfontosabb tény azonban az, hogy a strómális azaz a mikrokörnyezetet képviselő faktorok a kísérleti állatból származnak, míg a tumor humán eredetű. Azaz az állatból frissen eltávolított tumorszövetből izolált *egységes* mRNS poolból megfelelően species-specifikus próbákat hordozó, a humán és a gazdaállatot képviselő (többnyire egér) chip-re hibridizálva potenciálisan elkülöníthetjük a tumor és host eredetű génexpressziós mintázatot.

Humán melanómából származó egysejtszuszpenziót implantáltunk újszülött, inbred, veleszületetten immunhiányos (scid) egerekbe. Azonos korú, tumormentes állatok megfelelő lokalizációjából származó szövetminták génexpressziós mintázatát összevetve a tumorhordozó állatokéval arra kerestük a választ, hogy melyek azok a host eredetű faktorok amelyek kiszelektálják a metasztaikus fenotípust az újszülött állatban.

A metasztatikus fenotípus (genotípus) a primer tumort elhagyó azon tumorsejtek sajátossága, amelyek távoli szervekben megtelepedve új kolóniát képesek létrehozni. Ezen geno/fenotípus kétségtelenül egy olyan szelekciós hatásra alakul ki, amelyben a host eredetű mikrokörnyezet döntő szerepet játszik. Modellünkben ennek a kölcsönhatásnak a molekuláris markereit igyekeztünk felkutatni majd ugyanezen modell segítségével a következő lépésben azoknak az áttétképzésben betöltött szerepét igazolni. Kérdéses azonban, hogy a primer tumorban mért expressziós paraméterek alapján levonhatók-e megbízható következtetések a távoli áttétek létrejöttével kapcsolatban. A metasztatizáló és nem metasztatizáló rendszer közötti különbségek vizsgálatával erre a kérdésre is megpróbáltunk választ adni.

A primer tumor egészének vizsgálata során át kell gondolnunk azt a lehetőséget is, hogy az általunk megfigyelt és fennálló eltérések a két csoportunk között (metasztatikus ill. nem metasztatikus) a primer tumor egységes sajátossága, vagy csak a metasztatikus kaszkádba kilépő sejtek kis csoportjának jellemzője. Utóbbi esetben lehetséges, hogy ezen kis csoportban megjelenő, akár nagyságrendben is eltérő változások a teljes mintapopuláció szintjén is szignifikáns mérhető eltéréseket hoznak létre, azaz markerként használhatók az áttétképzés lehetőségének előrejelzésére. Az primer tumorban ötszörösnél nagyobb expressziós különbséget mutató, metasztatikus szelekciós tényezőként számba vehető gének validációja során (Fam 187b, Lass5, DEAD box 60 polypeptide, Gm4262, CCL11, Pex2, Cathepsin L, CCL12 Ninein.) mindösszesen a CCL12 mutatott mindhárom humán xenograft állatmodellben emelkedett expressziót. A CCL8 egérben megtalálható homológja a CCL12, melynek kifejeződését megvizsgáltuk többféle humán melanóma implantációját követően a fent említett modellrendszer segítségével áttétképző valamint nem metasztatikus esetben. A metasztatikus hostban minden esetben emelkedett CCL12 expressziós szintet detektáltunk. Igazoltuk, hogy a humán melanómák egy kivételtől, az melanóma áttétből kialakított WM983B sejtvonaltól eltekintve nem expresszálják a kemokin humán változatát a CCL8-at. Az implantáció helyén található sejtes (strómális) elemek közül a

CCL8 expressziójáért felelős lehetséges komponenseket keresve megvizsgáltuk a dermális fibroblasztok, melanociták és a keratinocitákat CCL8 expresszióját. Közülük a fibroblasztok és a melanociták expresszálták a CCL8 kemokint. A áttétképzés komplex folyamatának vizsgálata során azonban nemcsak az egyes szereplőkre, hanem azok kapcsolatára is gondolnunk kell. A CCL8 hatását csak speciális kemokin receptorok (CCR1, CCR5) közvetítésével érheti el. A host sejtjei közül a fibroblasztokon, míg melanóma sejtvonalak esetén az A2058 és WM983B kivételével minden esetben kimutattuk CCR1 jelenlétét. CCR5 expressziót egyik esetben sem detektáltunk. A primer tumorban kialakuló meghatározott kemokin millieu lokális hatásának vizsgálatára migrációs és proliferációs vizsgálatokat végeztünk. A kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy 500 ng/ml-es CCL8 koncentráció a humán melanómák proliferációját gátolja, amely gátlás a koncentráció emelésével megszűnik. E tekintetben a dermális fibroblasztok viselkedése megegyezik a melanómákkal, azonban az említett hatás mindösszesen egy tumorsejtvonalra és a dermális fibroblasztokra korlátozódott, s így a CCL8 viabilitásra gyakorolt hatásának biológiai relevanciája erősen kérdéses. A CCL8-at közvetlenül a sejtekhez adva a kontrollhoz képest a vizsgált humán melanóma sejtvonalak és a melanociták migrációja visszaesett, ezzel szemben a fibroblasztoké nőtt. Kemoattraktánsként alkalmazva a CCL8 fokozta a tumorsejtek migrációját a kezeletlen kontrollhoz képest, a melanociták migrációját nem befolyásolta a fibroblasztokét pedig gátolta. A migrációs és proliferációs vizsgálatokban vizsgált sejtek mindegyike rendelkezett CCR1 receptorral, mely a kemokin hatásért felelős kötődés alapjául szolgálhat.

Xenotranszplantációs modellünk lehetőséget kínált arra, hogy az áttétképzés folyamatának különböző lépéseiből származó tumorsejtek viselkedését külön-külön vizsgáljuk. Nevezetesen a primer tumorból, a keringésből és a tüdőáttétekből származó tumorsejteket *in vitro* tenyésztettük tovább, s két-három passzázs után a strómális komponensektől megszabadított tumortenyészeteket tesztelhettük. Eredményeink azt mutatják, hogy a primer tumorból származó tenyészetek nem expresszálták a kemokint, ezzel szemben a keringésből izolált tumorsejt utódpopulációjában és tüdőáttétből származóban megjelennek a CCL8-at expresszáló klónok. Természetesen mindebből nehéz lenne messzemenő következtetéseket levonni, hisz a keringésben lévő tumorsejt egy olyan „köztes állapotot” képvisel, ami csak lehetőség, de nem biztosíték az áttétek létrehozására. Immunhisztokémiai reakciókkal sikerült a primer tumor területén is

kimutatni a CCL8-at expresszáló tumorsejteket, azonban ezek aránya elenyésző volt a teljes tumorsejtpopulációhoz viszonyítva. Ugyanezen tumor primer tenyészetében PCR reakcióval CCL8 expressziót nem tudtunk kimutatni. Szintén érdekes jelenség, hogy a vizsgált sejtvonalak között található primer tumorból származó WM983A nem, ezzel szemben annak nyirokcsomó áttétéből kialakított WM983B sejtvonal sejtjei expresszálják a CCL8-at.

Mivel a xenotranszplantációs modelljeinkben mindhárom humán melanóma sejtvonal esetén mennyiségi különbséget találtunk metasztatikus és nem metasztatikus primer tumor CCL12 expressziójában a strómális komponensek szintjén, megvizsgáltuk, hogy ez a különbség bármely formában detektálható-e humán klinikai mintákon, távolabbi célként használható-e a progressziót előre jelző faktorként.

Melanómát hordozó betegek mintáit két csoportra (nem metasztatikus, ahol öt év követési idő során a betegnél áttétek kialakulását nem tapasztaltuk és metasztatikus, ahol a betegben öt éven belül áttétek alakultak ki) osztva értékeltük ki. E betegek szérumában ELISA teszttel mértük a CCL8 kemokin mennyiségét. Mindkét csoporton belül elkülönült egy alacsony és egy magasan expresszáló alcsoport. Az expresszió mértéke azonban a nem metasztatikus csoportban magasabb volt, mint a metasztatikus csoportban. A statisztikailag is igazolható különbség kimutatásához azonban a későbbiek során nagyobb esetszámra lesz szükség.

A primer tumorok CCL8 expressziója közti különbséget mérve első közelítésben az áttétet nem hordozó betegek mintái és a távoli áttéttel bíró betegek mintái között nem találtunk különbséget. Ebben az összehasonlításban az áttét lokalizációjától függetlenül valamennyi áttéthordozóból származó primer tumor adatait vetettük össze a nem metasztatikus betegek primer tumorából származó CCL8 expressziójával. Azonban elkülönítve összevetve a tüdőáttétekkel rendelkező betegek primer tumorának kemokin expresszióját a nem metasztatizálók valamint májáttétekkel rendelkezőkével a különbség már szignifikánsnak bizonyult. A CCL8 hatás közvetítésében szerepet játszó receptor, a CCR1 expressziós szintjében a primer tumorok nem mutattak eltérést, azaz közel azonos expressziós szinttel rendelkezik az áttétet hordozó és az áttétektől mentes betegek primer tumora. A csontáttéttel rendelkező betegek primer tumorának CCL8 expresszióját májáttéttel rendelkező betegekével összehasonlítva szintén szignifikáns

különbséget mértünk, mindeközben viszont a CCR1 receptor expresszióban nem következett be változás.

Annak tisztázására, hogy ez az expresszió a tumorsejtekhez, vagy a strómális sejtekhez köthető immunhisztokémiai reakcióval vizsgáltuk a CCL8 protein megjelenését a klinikai mintákban. A pozitív sejtek aránya alacsony volt, és a stróma mellett a tumorokban is detektálható volt. A kisszámú CCL8 expresszáló sejt inkább lokális, mint egész tumorra kiterjedő hatásra enged következtetni.

Kísérletes modellünkben a strómális sejtek kemokin termelése a metasztatikus hostban magasabb volt, mint a nem metasztatikus host esetében. Humán primer tüdőáttétet okozó melanómák esetében azonban ez a reláció megfordult, és a nem metasztatikus primer tumorban találunk nagyobb mértékű kemokin expressziót. Ennek okát egy *in vitro* modell segítségével próbáltuk kideríteni.

A tumorsejtek és az őket körülvevő strómális sejtek kooperációját a stróma szempontjából oly módon modelleztük, hogy humán dermális fibroblaszt tenyészetet humán melanóma (HT199) valamint humán leukémia (K562) sejttenyészetek felülúszójával kezeltük és valósidejű PCR segítségével mértük, hogyan változik annak CCL8 expressziója. A kontrollként szerepelt olyan tenyészet is, amely tiszta formában kapott rekombináns humán CCL8-at. Mindkét humán tumor felülúszójával történő kezelést követően a humán dermális fibroblasztok CCL8 expressziója szignifikánsan megemelkedett. Ezzel szemben a direkt CCL8 kezelés hatására a fibroblaszt saját CCL8 expressziója szignifikánsan csökkent.

A fentebb bemutatott kezeléseket követő hatások kialakulásának időfüggése arra utalt, hogy a kemokin termelődést a transzkripció szintjén befolyásoltuk, amit valósidejű PCR-al mérni is tudtunk. A CCL8 hatásának pontosabb megértéséhez a változás potenciális közvetítőjeként a miRNS-ek szerepe is felmerült [57]. 800 vizsgált miRNS közül a dermális fibroblasztokban számos expressziója változott drámaian a kezelés hatására, s így lehetőség volt egy úgynevezett CCL8 hatás-specifikus mintázat létrehozására. Közülük az irodalmi adatok szerint is a CCL8 expresszióját szabályozó miR146a-nak a mennyiségi viszonyait vizsgáltuk meg a fentebb említett humán klinikai mintákon [58]. Ezen miRNS-eknek az expressziójában szignifikáns különbséget igazoltunk humán metasztatikus/nem metasztatikus betegcsoportjaink között is. Mivel a miRNS-ek kimutatása egyszerűbb és kevésbé érzékeny a rutin szövetfixáló eljárások

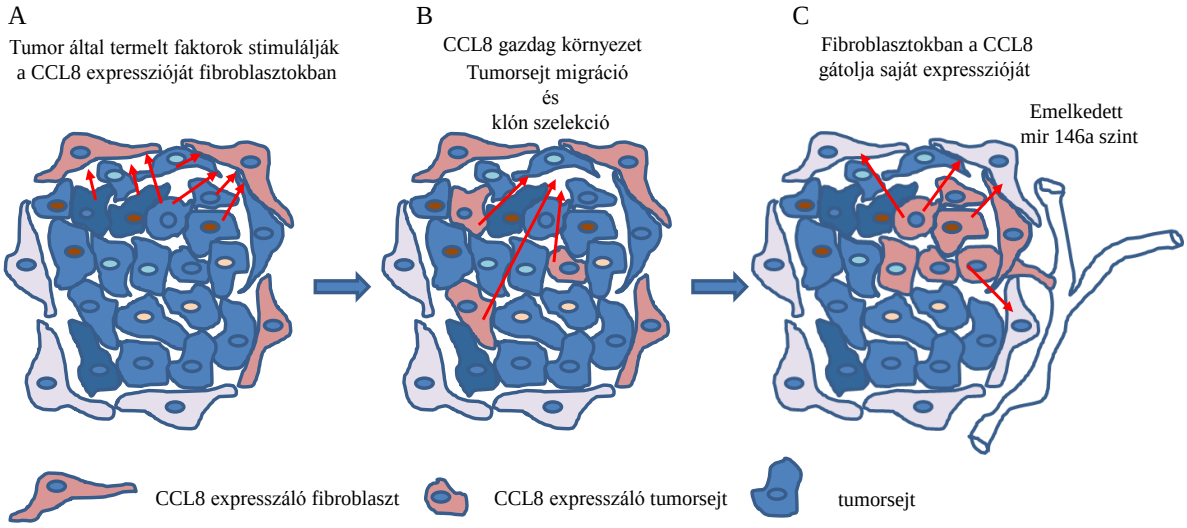
károsító hatására, a miR146a potenciális diagnosztikus/prognosztikus faktorként is szerepet játszhat a melanóma patológiájában.

A xenotranszplantációs modellrendszerben kevéssé szigorú feltételek mellett még további öt gén volt, melyek vizsgálatát klinikai mintákon megpróbáltuk validálni, azonban az említett gének a CTSL, DEAD BOX 60, FAM 168, PXMP és a LASS 5 a peremfeltételeken túl a klinikai minták vizsgálata során sem bizonyult metasztázis-asszociáltnak, így a továbbiakban nem képezték vizsgálatunk tárgyait.

Érdekes jelenség, hogy a kísérletes állatmodellünk és a humán műtéti anyagokon végzett méréseink eredményei látszólag ellentmondanak egymásnak. Az *in vitro* kísérletes rendszer felépítése többek között azt is igyekszik megfejteni (ami egyben súlyosan felveti az állatmodellek kritika nélküli alkalmazásának bírálatát is), hogy a humán műtéti mintákban mért eredmények miért térnek el ettől. Tény, hogy az állatmodellben a host eredetű expresszióra helyeztük a hangsúlyt, hisz eredendően az áttétképzés host eredetű faktorainak a vizsgálata volt a célunk. A tumor-host kölcsönhatás azonban kihagyhatatlan része az áttétképzésnek. Ezt igyekeznek bizonyítani a dolgozat *in vitro* kísérletei: a host eredetű faktorok CCL8 expresszióját gátolja a tumor eredetű CCL8, míg a fokozott host eredetű CCL8 termelés fokozott motilitást ad a tumorsejteknek. A két oldal közötti egyensúly (vagy annak eltolódása) lehet egyik komponense az áttétképzés folyamatának. Azaz mivel a klinikai mintákban mindkét oldal kumulált kimenetét mértük, ez a vektor már nem a host, hanem a host-tumor kölcsönhatás kimenetét jelzi és értelemszerűen nem is lehet egyenlőségjelet tenni a két vizsgálat között. Ritka szerencsének – ám kétségtelenül a biológiai rendszerektől távolabb esőnek – bizonyult volna, ha egyértelmű megfelelést igazolunk a két rendszer között.

A kísérleti rendszerben egy tiszta helyzetet modelleztünk, ahol a host kemokinjeit nem expresszáló tumort implantáltunk, majd a host mint egyedüli ccl12 forrás mennyiségi változásait vizsgáltuk a metasztatizáláshoz kapcsolódóan. A humán mintáinkban immunhisztokémiai reakcióval igazoltuk, hogy a tumor környezete mellet a tumorsejtek kis csoportjai is expresszálják a ccl8-at, nem csak a host sejtek. Munkahipotézisünk szerint, az állatkísérletes modellünkben a host-tumor kölcsönható rendszer csak részben valósul meg. Azaz a tumor eredetű faktorok stimulálják a környezetükben elsősorban a dermális fibroblasztokban az egér CCL8 termelését. A kísérlet tanúsága szerint az el is látja kemoattraktáns funkcióját, azonban minden jel

szerint az ellenkező irányban a hatás (feltehetőleg szerkezeti okokból) nem működik. Ezt már csak humán mintáinkon követhetjük nyomon, ahol a környezetből származó CCL8 a tumorsejtek kemokintermelését is elindítja. *In vitro* kísérleteink szerint ez visszacsatoló rendszerként működik, hisz mint láttuk, külső CCL8 hatásra a fibroblasztok CCL8 expressziója leáll. Azaz, ha a primer tumorban felnő egy (tüdő) áttétképzésre hajlamos CCL8-at expresszáló populáció, az visszaszoríthatja a fibroblasztok CCL8 termelését így össztumor szintjén alacsonyabb relatív expressziós szintet mérhetünk. Jól beleillik ebbe a szabályozó körbe a miR146 expressziója, amely értelemszerűen visszaállítani igyekszik az eltolt egyensúlyt, azaz overesszpesszált az áttétképző tumorokban. Ezzel szemben az áttétetet nem képző tumorokban a fibroblasztok CCL8 expresszióját nem szorítja vissza semmi, magas relatív expressziójához alacsony miR146 expresszió társul. (31. ábra.)



31.ábra A CCL8 hatás hipotetikus modellezése (saját ábra)

A tumorsejtek és az őket körülvevő környezet közötti kommunikáció a sejtfelszíni molekulák közvetítésével történik. Ezek egyike a kollagén XVII amely a normál fiziológiás megjelenésén túl osztódó melanómákban is kimutatható. Expresszióját xenotranszplantált humán primer melanómában is kimutattuk. Igazolni tudtuk, hogy a progresszió során a primer tumorból kiváló metasztatikus sejtek a távoli szervekben alapított elkülönülő áttétek szintén megtartották eme tulajdonságukat. A proteolitikus hasításon átesett molekulának a sejt funkciójában betöltött szerepét a viabilitást és

letapadást befolyásoló, valamint apoptózist indukáló hatásán keresztül *in vitro* kísérletek során vizsgálatuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a kollagén XVII endodoménnel rendelkező melanóma sejtek célzott kollagén XVII kezelése a viabilitást csökkenti, s egyben az apoptotikus képességét növeli.

Szintén a tumorsejtek környezetéből közvetítenek jeleket a tumorsejt felé a CD44 sejtfelszíni molekulák, amelyek szerepe számos daganat, így többek között a humán melanómák áttétképzésében is meglehetősen ellentmondásosnak bizonyult. A jelenség hátterében igen nagy valószínűséggel az áll, hogy elsősorban daganatokban az egységes „CD44" néven definiált molekula valójában számos, egymástól szerkezetileg és funkcionálisan eltérő molekulát fed, amely a molekula alternatív splicingja révén keletkezik és akár egyszerre, egyidejűleg van jelen a tumorsejtek felszínén. A szerkesztési folyamat során a molekula variábils exonjai közül meghatározott számú és kombinációjú messenger RNS molekula szerkesztődik össze, melynek fehérjeterméke egymástól eltérő funkcióval bír. Az irodalmi adatok nem kezelik megfelelő súllyal azt a tényt, hogy a keletkezett fehérjék csak nevükben azonosak, funkcionálisan eltérőek lehetnek. Nehéz vizsgálhatósága miatt meglehetősen kevés eredmény számolt be az így keletkező molekuláris mintázatról, illetve ennek a molekuláris lenyomatnak tumortípusra jellemző sajátosságairól. Munkacsoportunk vizsgálatai igazolták, hogy a progresszió folyamán a primer tumor és az abból kiinduló távoli áttétek CD44 mintázata megőrzött maradt. Ezen mintázatot alkotó CD44 molekulák típusait azonosítottuk újgenerációs szekvenálással megalapozva annak a lehetőségét, hogy eltérő funkciójú variánsok korrekt azonosításával megtaláljuk az áttétképzéssel valóban összefüggésben lévő CD44 molekulaváltozatokat.

8. Következtetések

Számos kemokin humán melanómák áttétképzésében betöltött szerepe jól ismert tény. Vizsgálataink során a család egy ebben a vonatkozásban kevésbé ismert tagjának a CCL8-nak, mint host eredetű faktornak az áttétképzésben betöltött szerepét támasztottuk alá.

Eredményeink azt igazolják, hogy a CCL8 ill. xenotranszplantált modellünkben annak egér homológja a CCL12 szerepet játszik a humán melanómák áttétképzésének folyamatában. Dermális fibroblasztok a tumor által termelt faktor(ok) hatására szignifikánsan megemelik a CCL8 termelésüket. Ez a CCL8 kemoattraktánsként fokozza a tumorsejtek migrációs aktivitását. Ugyanakkor igazoltuk, hogy a fibroblasztokban CCL8 kezelés hatására csökken a CCL8 expresszió. Azaz a kettő kényes egyensúlya, a tumor serkentő és magának a CCL8-nak a gátló hatása együtt adja azt képet, amelyet a molekuláris vizsgálatok egy-egy pillanatfelvétele során látunk

A vizsgált sejtfelszíni molekulák közül a kollagén XVII expressziót quantitatívan mérve igazoltuk, hogy annak mennyisége változatlan a tumorprogresszió során. Kísérleteink eredménye szerint azonban kollagén XVII endodoménnel rendelkező melanóma sejtek célzott kollagén XVII kezelése a viabilitást csökkenti, s egyben az apoptotikus képességét növeli, amely eredmény felveti a molekula terápiás alkalmazhatóságának lehetőségét is.

Az általunk vizsgált másik sejtfelszíni molekulának a CD44-nek tíz alternatív splice variánsa expresszálódik következetes mintázatban a humán melanómákban. Igazoltuk, hogy ez a mintázat a progresszió során kvalitatívan stabil, kvantitatívan azonban drámai változást mutat az áttétképző tumorsejtekben.

8.1. Az új megállapítások

- Humán melanóma xenograft állatmodell segítségével meghatároztuk a primer tumor strómális komponenseiben a tumorprogresszió során bekövetkező génexpressziós változásokat.

- A 20.000 vizsgált gén közül a 19 legnagyobb expressziós változást mutató gén validációját elvégezve több tekintetben a CCL12 kemokin ligandot találtuk legkiemelkedőbb progresszió-asszociált host eredetű faktornak.

- *In vitro* és *in vivo* vizsgálataink során jellemezve a CCL12 tumorprogresszióban betöltött szerepét az alábbi megállapításokat tettük:
    - A CCL12 humán homológjának a CCL8-nak, valamint receptorának a CCR1-nek az expresszióját nukleinsav és fehérje szinten is kimutattuk humán primer melanómákban
    - A CCL8 tumorsejtek viabilitására gyakorolt hatása nem jelentős, viszont kemoattraktánsként fokozza azok migrációját
    - Humán klinikai mintákban a tüdőáttétet adó primer melanómák CCL8 expresszió szintjén elkülöníthetőek voltak a nem metasztatikus mintáktól.
    - A progresszió különböző állomásait nukleinsav valamint protein szinten vizsgálva megállapítottuk, hogy a CCL8 keringő tumorsejtekben és a metasztázisokban egyaránt kimutatható
    - *In vitro* dermális fibroblasztokban a CCL8 csökkentette saját expresszióját

- Egy 800 miRNS-t tartalmazó panelt vizsgálva meghatároztuk, hogy közülük melyek azok, amelyek a CCL8 kezelés hatására szignifikáns változást mutatnak humán dermális fibroblasztokban. Humán klinikai mintákon igazoltuk, hogy a kiemelten kezelt miRNS-ek közül a miR146a eltérő mértékben van jelen a metasztatikus és nem metasztatikus humán primer melanómákban

- Kimutattuk, hogy melanóma xenograft állatmodellünkben a kollagén XVII expresszió a primer tumorban és a szervi metasztázisokban nem változik, valamint, hogy a kollagén XVII endodoménnel rendelkező melanóma sejtek célzott kollagén XVII kezelése azok viabilitást csökkentette ugyanakkor az apoptotikus képességét növelte

- Meghatároztuk a CD44 humán melanómákra jellemző alternatív splice-mintázatát és igazoltuk, hogy ez a mintázat a tumorprogresszió során kvalitatívan stabil marad, míg kvantitatívan egyértelműen változást mutat.

9. Összefoglalás

A CCL8 áttétképzésben betöltött szerepét, *in vitro* humán sejtvonalakon és *in vivo*, kísérletes állatmodellben valamint klinikai mintákon teszteltük. A sejtekre gyakorolt hatás vizsgálatára proliferációs és migrációs vizsgálatokat, majd a CCL8 hatásért felelős miRNS pool meghatározását NanoString Assay-val végeztük. Az általunk alkalmazott állatmodell segítségével kimutattuk, hogy humán melanóma sejtvonalak ortotopikus implantációját követően a metasztatizáló versus a nem metasztatizáló primer melanómák CCL12 expressziójában -amely az állatkísérletes modellben egyértelműen jól elkülöníthetően a strómális sejtekhez köthető- mennyiségi különbség áll fenn. A CCL12 humán homológja, a CCL8 szintén kimutatható expressziós különbséget mutat az áttétet nem hordozó betegek primer tumorában a tüdőáttétet hordozó betegek primer tumorával szemben. A CCL8 receptor (CCR1) kifejeződés mértékében nem találtunk különbséget a két csoport között. A sejtvonalak molekula-szintű és immunhisztokémiai vizsgálatával egyaránt azt találtuk, hogy a tumorsejtek döntő hányada nem expresszálja a CCL8-at. A strómális komponensek közül a dermális fibroblasztok és a melanociták is CCL8 forrásként működnek. Igazoltuk, hogy exogén CCL8 a proliferációra nincs számottevő hatással, viszont a vizsgált tumorsejtvonalak migrációs potenciálját kemoattraktánsként megnövelte. A strómában a legnagyobb nem mobilis kemokin forrásként a fibroblasztok szolgálnak, amely expressziós változásai párhuzamba állíthatók bizonyos miRNS populációk változásával. 800 féle miRNS kísérletes mintákon történő kvantitatív mérésével meghatároztunk egy CCL8 hatásra jellemző host-specifikus miRNS profilt. Közülük egy, a miR146a mennyiségi elemzését klinikai mintákon is elvégeztük, összehasonlítva az áttétet nem hordozó betegek primer tumorában expresszált mir146a mennyiségét az áttétet hordozó betegek primer tumorával szemben. A melanóma progressziója során az áttétképzés és a CCL8 produkció között összefüggést mutattunk ki, mely folyamat jó markere lehet a miR146a változása. Xenotranszplantációs állatkísérleti modellrendszerben vizsgálva a kollagén XVII expresszió mennyisége a primer melanómában valamint a tüdő és agyi metasztázisokban is megtartottnak bizonyult. Az endodomén extracelluláris részét felismerő 9g2 antitesttel történt kezelés a kontrollhoz képest csökkentette a HT199 melanóma sejtek viabilitását, s növelte az apoptózist. A melanóma progressziója során molekuláris mintázatát megtartott CD44 molekulának 10 alternatív splice variánsát azonosítottuk be, s adtuk meg annak konkrét molekuláris felépítését.

10. Summary

Most deaths from melanoma are due to metastases. The process is complex, which is only partially understood today. In the literature there are several data on the importance of the chemokine system and tumor-host interaction, yet this still remains only a partly discovered field of tumor progression. Attempt was made to answer the question 'What changes would appear on the host side in the progression of human melanoma?' To investigate the role of tumor microenvironment, we set up an animal model capable of separating host factors which play central role in metastasis formation. One of these, CCL12, was selected and tested together with its human homologue (CCL8) in the animal model and on clinical, human primary melanoma samples. Proliferation and migration assays were performed on tumor and non-tumor cells by adding exogene CCL8, and changes in miRNA pool were analysed after CCL8 treatment with nano string assay. In our xenotransplant animal model, we demonstrated the expression differences of CCL12 chemokine in the host cells between metastatic and non-metastatic primary tumors. The relative expression differences of its human homologue, CCL8 were demonstrated in non-metastatic primary human melanoma tumors as well as those forming lung metastases, using quantitative real time PCR experiments and immunohistochemistry. In clinical samples, when examining the tumor and the host together, the cumulative (tumor and host) CCL8 expression was lower in the group in which human primary melanoma formed lung metastasis compared to non-metastatic primary tumors. We could not detect significant difference in CCL8 receptor (CCR1) expression between the two groups. Increased migration of the examined tumor cell lines was observed when CCL8 was applied as a chemoattractant. Furthermore, we examined changes in miRNA profile resulted by CCL8 and miR146a appears to be a promising prognostic marker for following this process. The quantity of collagen XVII expression in xenotransplanted animal model proved to be normal in primary melanoma, lung and brain metastases. Treatment with 9g2 antibody, which recognise the extracellular region of the endodomain, reduced the viablity of HT199 melanocytes and increased apoptosis when compared to control. We identified 10 alternative splice variant of CD44 molecule, that kept its molecular pattern during progression of melanoma, and described its molecular configuration.

11. Irodalomjegyzék

1. Psaila B, Lyden D. (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. Nat Rev Cancer, 9(4):285-93.

2. Land,H., Parada,L.F. and Weinberg,R.A. (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science, 222:771–778.

3. Vogelstain,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smith,A.M. and Bos,J.L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. N. Engl. J. Med., 319:525–532.

4. Kinzler,K.W. and Vogelstein,B.: (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell, 87:159–170.

5. Folkman J: (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol,29:15–8.

6. J. Taipale, J. Keski-Oja: (1997) Growth factors in the extracellular matrix. FASEB J., 11:51–59

7. Weigelt B, Bissell MJ: (2008) Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. Semin Cancer Biol.,18:311–21.

8. Joyce JA, Hanahan D: (2004) Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. Cell Cycle.,3:1516–619.

9. Xu L, Deng Q, Pan Y, Peng M, Wang X, Song L, Xiao M, Wang Z: (2014) Cancer-associated fibroblasts enhance the migration ability of ovarian cancer cells by increasing EZH2 expression. Int J Mol Med., 33(1):91-6.

10. Descot A, Oskarsson T: (2013) The molecular composition of the metastatic niche. Exp Cell Res., May 21.

11. Paget, S. : (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet, 1:571–573.

12. Hart, I. R. & Fidler, I. J. (1980) Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. Cancer Res., 40:2281–2287.

13. Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME, Lengyel E: (2012) MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. Cancer Discov., (12):1100-8.

14. Liotta, L. A., Steeg, P. S. & Stetler-Stevension, W. G.: (1991).Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell, 64: 327.

15. Werb, Z.: (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell, 91:439-442.

16. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J: (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer., 4:274-84.

17. Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity, 12:121-127.

18. Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M, Massagué J. (2007) Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. Proc Natl Acad Sci U S A., 104(16):6740-5.

19. Tímár J, Gyorffy B, Rásó E: (2010) Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? Clin Exp Metastasis, (6):371-87.

20. Jeffs AR, Glover AC, Slobbe LJ, Wang L, He S, Hazlett JA, Awasthi A, Woolley AG, Marshall ES, Joseph WR, Print CG, Baguley BC, Eccles MR. (2009) A gene expression signature of invasive potential in metastatic melanoma cells. PLoS One., 4(12):e8461.

21. Xu L, Shen SS, Hoshida Y, Subramanian A, Ross K, Brunet JP, Wagner SN, Ramaswamy S, Mesirov JP, Hynes RO. (2008) Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases. Mol Cancer Res., (5):760-9.

22. Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K. (2008) Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. Clin Cancer Res.,14:5013–21.

23. Podsypanina K, et al. (2008) Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in thelung. Science, 321:1841–4.

24. Slominski AT, Carlson JA. (2014) Melanoma resistance: a bright future for academicians and a challenge for patient advocates. Mayo Clin Proc., 89:429-433.

25. Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. (2013) International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev., 66(1):1-79.

26. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. (2006) The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. Genome Biol.,7(12):243.

27. Nicolson GL. (1993) Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. Cancer Metastasis Rev., 12(3-4):325-43.

28. Kalluri R1, Weinberg RA. (2010) The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest., 120(5):1786.

29. Zeidman I. (1957) Metastasis: a review of recent advances. Cancer Res., 17(3):157-62.

30. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E and Zlotnik A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 410(6824):50-56.

31. Wendt MK, Cooper AN and Dwinell MB. (2008) Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. Oncogene, 27(10):1461- 1471.

32. Speetjens FM, Liefers GJ, Korbee CJ, Mesker WE, van de Velde CJ, van Vlierberghe RL, Morreau H, Tollenaar RA and Kuppen PJ. (2009) Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. Cancer Microenviron., 2(1):1-7.

33. Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, Saiki I, Takano Y and Fuse H. (2008) Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. Cancer Sci., 99(3):539-542.

34. Franco R, Cantile M, Scala S, Catalano E, Cerrone M, Scognamiglio G, Pinto A, Chiofalo MG, Caraco C, Anniciello AM, Abbruzzese A, Caraglia M and Botti G. (2010) Histomorphologic parameters and CXCR4 mRNA and protein expression in sentinel node melanoma metastasis are correlated to clinical outcome. Cancer Biol Ther., 9(6):423-429.

35. Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E and Hoon DS. (2004) CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. Clin. Cancer Res., 10(7):2351-2358.

36. Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W and Forster R. (2005) Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expressionof chemokine receptor CCR7. Int. J. Cancer., 116(5):726-733.

37. Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT and Hwang ST. (2001) Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. J. Natl. Cancer Inst., 93(21):1638-1643.

38. Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST. (2002) Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. Cancer Res., 62(24):7328-7334.

39. Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, Takabayashi A, Yamaoka Y, Manabe T, Inaba K, Minato N, Oshima M and Taketo MM. (2004) Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. Cancer Res., 64(11):4010- 4017.

40. Amersi FF, Terando AM, Goto Y, Scolyer RA, Thompson JF, Tran AN, Faries MB, Morton DL and Hoon DS. (2008) Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. Clin. Cancer Res., 14(3):638-645.

41. Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Filosa A, Pieramici T, Rubini C, Biagini G and Offidani A. (2006) Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. Eur. J. Cancer., 42(8):1181-1187.

42. Nelson PJ, Krensky AM. (2001) Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. Immunity., 4:377-86.

43. M.F. Segura, D. Hanniford, S. Menendez, L. Reavie, X. Zou, S. Alvarez-Diaz, J. Zakrzewski, E. Blochin, A. Rose, D. Bogunovic, D. Polsky, J. Wei, P. Lee, I. Belitskaya-Levy, N. Bhardwaj, I. Osman, E. Hernando. (2009) Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 pp:1814–1819.

44. Gaziel-Sovran, M.F. Segura, R. Di Micco, M.K. Collins, D. Hanniford, E. Vega-Saenz de Miera, J.F. Rakus, J.F. Dankert, S. Shang, R.S. Kerbel, N. Bhardwaj, Y. Shao, F. Darvishian, J. Zavadil, A. Erlebacher, L.K. Mahal, I. Osman, E. Hernando. (2011) MiR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis Cancer Cell, 20, pp: 104–118.

45. Pencheva, H. Tran, C. Buss, D. Huh, M. Drobnjak, K. Busam, S.F. Tavazoie. (2012) Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis Cell, 151, pp:1068–1082.

46. Penna, F. Orso, D. Cimino, E. Tenaglia, A. Lembo, E. Quaglino, L. Poliseno, A. Haimovic, S. Osella-Abate, C. De Pitta, E. Pinatel, M.B. Stadler, P. Provero, M.G. Bernengo, I. Osman, D. Taverna (2011) MicroRNA-214 contributes to

melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C he EMBO journal., 30:1990–2007.

47. Kitago, S.R. Martinez, T. Nakamura, M.S. Sim, D.S. Hoon (2009) Regulation of RUNX3 tumor suppressor gene expression in cutaneous melanoma Clin. Cancer Res., 15 pp:2988–2994.

48. 16Yamazaki, T. Chijiwa, Y. Inoue, Y. Abe, H. Suemizu, K. Kawai, M. Wakui, D. Furukawa, M. Mukai, S. Kuwao, M. Saegusa, M. Nakamura (2012) Overexpression of the miR-34 family suppresses invasive growth of malignant melanoma with the wild-type p53 gene Exp. Ther. Med., 3 pp: 793–796.

49. Liu, M.T. Tetzlaff, R. Cui, X. Xu (2012) MiR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1 Am. J. Pathol., 181 pp: 1823–1835.

50. Borradori L, Sonnenberg A (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. J Invest Dermatol., 112:411–418.

51. Franzke CW, Tasanen K, Borradori L, Huotari V, Bruckner-Tuderman L (2004) Shedding of collagen XVII/BP180: structural motifs influence cleavage from cell surface. J Biol Chem, 279:24521–24529.

52. S Goodison, V Urquidi, D Tarin (1999) CD44 cell adhesion molecules. Mol Path., 52:189-196.

53. Ghigna C, Valacca C, Biamonti G. 2008 Alternative splicing and tumor progression. Current genomics, (8):556–70.

54. Naor, David, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L FY. (2002) Display Settings: CD44 in cancer. Crit Rev Clin Lab Sci.;39(6):527–79.

55. 32. Andersen AP, Moreira JM, Pedersen SF. (2014) Interactions of ion transporters and channels with cancer cell metabolism and the tumour microenvironment. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 1638:20130098.

56. 33. Leber MF, Efferth T. (2009) Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). Int J Oncol., 4:881-95.

57. 34. Hao J, Zhao S, Zhang Y, Zhao Z, Ye R, Wen J, Li J. (2014) Emerging role of microRNAs in cancer and cancer stem cells. J Cell Biochem., 4:605-10.

58. 35. Rom S, Rom I, Passiatore G, Pacifici M, Radhakrishnan S, Del Valle L, Piña-Oviedo S, Khalili K, Eletto D, Peruzzi F. (2010) CCL8/MCP-2 is a target for mir146a in HIV-1-infected human microglial cells. FASEB J., 7:2292-300.

12. Saját Publikációk

A dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények:

Barbai T, Fejős Z, Puskas LG, Tímár J, Rásó E. (2015) The importance of microenvironment: the role of CCL8 in metastasis formation of melanoma Oncotarget, 6(30):29111-28.

Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E. (2012) Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. Histochem Cell Biol., 138(4):653-67.

Raso-Barnett L, Banky B, Barbai T, Becsagh P, Timar J, Raso E. (2013) Demonstration of a Melanoma-Specific CD44 Alternative Splicing Pattern That Remains Qualitatively Stable, but Shows Quantitative Changes during Tumour Progression. *PLoS One.*,8(1):e53883.

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Garay T, Molnár E, Juhász É, László V, Barbai T, Dobos J, Schelch K, Pirker C, Grusch M, Berger W, Tímár J, Hegedűs B. (2015) Sensitivity of Melanoma Cells to EGFR and FGFR Activation but Not Inhibition is Influenced by Oncogenic BRAF and NRAS Mutations. Pathol Oncol Res., 21(4):957-68.

Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T, Timar J, Kovalszky I, Cserepes M, Rozsas A, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. (2015) Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. J Thorac Oncol., 10(5):738-46.

Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, Rozsas A, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. (2014) Subtype-specific

KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. Eur J Cancer, 50(10):1819-28.

Moldvay J, Barbai T, Bogos K, Piurko V, Fillinger J, Popper HH, Tímár (2013) EGFR autophosphorylation but not protein score correlates with histologic and molecular subtypes in lung adenocarcinoma J. Diagn Mol Pathol., 22(4):204-9.

Rásó E, Barbai T, Gyõrffy B, Tímár J. (2013) Prognostic and predictive markers of malignant melanoma. Magy Onkol., 57(2):79-83

Madaras L, Baranyák Z, Kulka J, Szász AM, Kovács A, Lan PH, Székely B, Dank M, Nagy T, Kiss O, Harsányi L, Barbai T, Kenessey I, Tőkés AM. (2013) Retrospective analysis of clinicopathological characteristics and family history data of early-onset breast cancer: a single-institutional study of Hungarian patients. Pathol Oncol Res., 19(4):723-9.

Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Tímár J, Becságh P, Rásó E. (2012) Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. Mol Cancer, 14;11:83.

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz A, Törzsök P, Kovalszky I, Barbai T, Rásó E, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. (2013) Molecular characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Pathol Oncol Res, 19(1):63-70.

Hegedûs Z, Barbai T, Tátrai P, Hegedûs B, Kiss A, Rásó E, Bodoky G. (2011) Effect of KRAS mutation status on the efficiency of Avastin therapy of colorectal cancer. Magy Onkol., 55(2):99-100.

Badalian G, Barbai T, Rásó E, Derecskei K, Szendrôi M, Tímár J. (2007) Phenotype of bone metastases of non-small cell lung cancer: epidermal growth factor receptor expression and K-RAS mutational status. Pathol Oncol Res., 13(2):99-104.

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni, hogy megérhettem a disszertáció megszületését, melynek elkészültéig számos problémán és akadályon átgázolva jutottunk el. Témavezetőmnek Dr. Rásó Erzsébetnek a segítége nélkül nem jöhetett volna létre a jelen írás, köszönetekben több is megilletné úgymint a szakmai fejlődés utmutatója valamint emberi emberiesség tekintetében eggyaránt. Köszönöm Tímár József Professzor Úrnak a lehetőségeket s a támogató hozzáállást. Köszönet a szülőknek, kik életre hívtak, valamint páromnak Hargitai Dórának s gyermekeinknek. Munkahelyi társaimnak (Dr.Rásó-Barnett Lívia, Dr.Bánky Balázs, Kun Sándor Károly, Piurkó Violetta) s bírálómnak Dr.Kiss Andrásnak mindent köszönök, s nem futva bele a felsorolások véget nem érő sorába igazán hálás vagyok mindenkinek kivel kapcsolatba kerültem eddigi életem során.