

A motogén szignál vizsgálata humán melanómasejtekben

Kenessey István

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Budapest
Témavezető: Dr. Tóvári József

Az extracelluláris mátrix (ECM) a daganatsejtek mozgása során nemcsak adhéziós felszínt jelent, hanem a benne megkötött növekedési faktorok a daganatos sejtek által történő enzimatisz emésztés következtében a sejt számára hozzáférhetővé válnak. Az epidermális növekedési faktor receptora (EGFR, erb-B1, HER-1), valamint a hepatocita növekedési faktor receptora (c-Met) számos gyakori rosszindulatú daganatban mutat kóros aktivációt, befolyásolva a tumorsejtek proliferációját, túlélését és mozgását. A tirozinkináz receptorokról induló jelátvitel szabályozásában szerepet játszik a kalcium-homeosztázis is. Preklinikai vizsgálatainkban humán melanómasejtek és az ECM kölcsönhatásának oligoszacharid heparinfragmensek segítségével történő befolyásolásán keresztül gátoltuk a sejt migrációt, állatkísérletes modellben pedig a tüdőkolonizációt. A melanómasejtek túlélésének szempontjából a Ca^{2+} -homeosztázisban szerepet játszó $P2X_7$ purinoreceptor *in vitro* anti-apoptikus hatásának bizonyult. A humán melanómasejtekben vizsgált tirozinkináz célpontok közül a HGF és az EGF receptorai konstitutív aktivitást mutattak. Mind a c-Met-, mind az EGFR-specifikus gátló szer *in vivo* xenograft modellben gátolta a melanómaáttétek kialakulását, azonban a primer tumor növekedésére csak a c-Met-szelektív szer hatott. Kísérleteink felvetik egy valódi kettős célponttal rendelkező TK-gátló fejlesztését. Magyar Onkológia 55:55-58, 2011

Kulcsszavak: tirozinkináz-gátlók, heparin-oligoszacharidok, áttétképzés, xenograft, humán malignus melanóma

The components of the extracellular matrix (ECM) are more than just adhesion sites for migrating tumor cells: following enzymatic degradation of the ECM, the release of sequestered growth factors increases, thus they become available for tumor cells. In a number of cancers dysfunction of epidermal growth factor receptor (EGFR) or hepatocyte growth factor receptor (c-Met) contribute to the malignant transformation that directly regulates cell proliferation, survival and motility. Furthermore, intracellular calcium level plays an important role in the regulation of the tyrosine kinase pathway. In our preclinical experiments, by administering heparin-derived oligosaccharides we influenced the interaction between human melanoma cells and ECM. In vitro cell migration was inhibited by heparin fragments. Moreover, two of the effective oligosaccharides reduced the number of lung colonies formed in SCID mice. In human melanoma cells an important element of Ca^{2+} homeostasis, the purinergic Ca^{2+} channel $P2X_7$ proved to be an anti-apoptotic protein. EGFR and c-Met showed constitutive activity in human melanoma cells, and their inhibition in vitro caused decreased proliferation, migration and elevated apoptosis. Administration of a selective c-Met-TKI significantly decreased primary tumor growth in vivo as well as the capacity for liver colony formation in SCID mice. Selective EGFR-TKI had less inhibitory effect on metastasis formation, and had no effect on the primary tumor. Our results suggest the necessity of a rational dual-specific drug design for the purpose in the therapy of malignant melanoma.

Kenessey I. Investigation of the motogenic signal in human melanoma cells. Hungarian Oncology 55:55-58, 2011

Key words: tyrosine kinase inhibitor, heparin oligosaccharides, metastasis, xenograft, human malignant melanoma

BEVEZETÉS

Az epidemiológiai adatok szerint a kután malignus melanóma incidenciája világszerte emelkedik, mely tendencia hazánkban is megfigyelhető. Nem túl gyakori előfordulása ellenére jelentőségét az adja, hogy egyike a legagresszívabb rosszindulatú daganatoknak, mely viszonylag korai fázisban ad szervi áttéteket. Mivel nagyfokú rezisztenciával rendelkezik mind az ismert kemo-, mind a sugárterápiával szemben, valamint alacsony apoptózis-készséggel rendelkezik, a sebészi megoldás sikertelensége esetén terápiája újfajta megközelítést tesz szükségessé.

Az áttétképzés egy összetett, többlépcsős, kaszkádszerű folyamat, melynek egyes lépéseit végigkíséri az adhézió, a degradáció és a migráció sajátos hármasa. Az extracelluláris mátrix egyes komponensei a daganatsejtek mozgása során többek között adhéziós felszint jelentenek. A heparinok az extracelluláris mátrix heparánszulfátjainak számos biológiai funkciójával interferálnak. Legismertebb klinikai alkalmazása az antikoagulációra használt szintetikus heparin, és annak származéka, az alacsony molekulásúlyú heparin (LMWH). Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy daganatos betegekben a heparinszármazékok alkalmazása késlelteti a tumorprogressziót és megnöveli a túlélést. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint állatkísérletes xenograft modellben az alkalmazott LMWH- és nem frakcionált heparin-kezelések (UFH) szignifikánsan gátolták a melanómasejtek tüdőkolonizációját és májáttétjeinek kialakulását. A heparin hatásának fontos része volt a tumorsejtek migrációjának és mátrixinváziójának blokkolása. További preklinikai modellben a tumorindukált angiogenezis gátlásának útján bebizonyosodott a lényegesen rövidebb, akár antikoaguláns hatással nem rendelkező heparinszármazékok tumorelles hatása is, azonban e heparinszármazékok közvetlenül a daganatsejtekre kifejtett hatását (pl. a migráció szempontjából) eddig még senki nem vizsgálta.

Egy sejtfelszíni molekula, a CD44 részt vesz a sejt-mátrix és a sejt-sejt kapcsolat kialakításában. A CD44 v3 exont tartalmazó izoformái képesek a heparánszulfát (HS) kötésére, a glikanációra. Ezen túlmenően a CD44v3-pozitív melanómák szignifikánsan rosszabb prognózist mutatnak, mint a negatív esetek. Mivel a v3 exont expresszáló CD44 izoformák HS-glikoziláltak, ezért felmerül annak a lehetősége, miszerint a CD44v3 a heparinszármazékok potenciális célpontja lehet.

Az extracelluláris mátrix a daganatsejtek mozgása során nemcsak adhéziós felszint jelent, hanem a benne megkötött növekedési faktorok a daganatos sejtek által történő enzimatis emésztés következtében a sejt számára hozzáférhetővé válnak. Ennek megfelelően a növekedési faktorok tirozinkináz (TK) receptorairól induló jelpályák fontos

szabályozói a tumorsejtek proliferációjának, túlélésének és mozgásának. Az epidermális növekedési faktor receptora (EGFR, erb-B1, HER-1), valamint a hepatocita növekedési faktor receptora (c-Met) számos gyakori rosszindulatú daganatban mutat kóros aktivációt (pl. glioblasztóma, nemkissejtes tüdőrák, fej-nyaki régió daganatai). A c-Met proteint megtalálható a normális epithelialis sejteken, valamint a melanocitákon. Ezen túlmenően a legtöbb melanómasejt önmaga is szintetizálja a HGF-et. Az autokrin és parakrin szabályozás, valamint a c-Met-overexpresszió korrelál a tumornövekedéssel, ami azt sugallja, hogy a c-Met/HGF jelátviteli útvonalnak alapvető szerepe van a melanóma progressziójában. Korábbi elemzések szerint humán malómasejtekben a c-Met mutációja a juxtamembrán doménben van, azonban soha nem írtak le alterációt a tirozinkináz doménben. Munkacsoportunk molekuláris biológiai elemzést végző munkatársai kimutatták, hogy saját melanómás sejtvonalaink esetén sem a molekula extracelluláris régiójában, sem a tirozinkináz doménben nem volt mutáció. Mivel a melanómasejtek expresszálták a receptort, emiatt feltételeztük, hogy a c-Met potenciális célpont lehet a malignus melanóma kezelésében.

A c-Met-tel ellentétben a malignus melanóma EGFR-expresszióját és esetleges biológiai funkcióját vizsgáló kísérletes munkák ellentmondásos eredményeket hoztak. Humán műtéti anyagokon végzett vizsgálatban az EGFR-génamplifikáció rossz prognosztikai tényezőnek bizonyult. Munkacsoportunk nyolc humán melanómás sejtvonalon végzett molekuláris biológiai elemzése kimutatta, hogy az EGFR extracelluláris részét tekintve sejtvonalaink közül kettőben nem volt mutáció, kettőben teljes, kettőben részleges deléciókat találtak, míg két sejtvonal splice variánst expresszált. A molekula intracelluláris részén alterációt nem tapasztaltak.

A tirozinkináz jelpálya számos elemét befolyásolja az intracelluláris kalciumszint, mely többek között apoptózisindukcióban nyilvánulhat meg. Az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásai melanómasejtekben is kritikusak a túlélés és a migrációs készség szempontjából. A kalcium fő forrása intracellulárisan az endoplazmás retikulum Ca^{2+} -raktára, extracellulárisan a plazmamembrán Ca^{2+} -csatornái, melyek között vannak feszültség-, illetve ligandum-aktivált típusok is. Munkacsoportunk expressziós chipes vizsgálatok segítségével, izolált humán melanocitákkal összehasonlítva kimutatta, hogy három, különböző genetikai hátterű melanómás sejtvonalban a rianodinreceptor 2, valamint két szabályozója overexpressziót mutat, azonban az áramlási vizsgálatok szerint a receptor nem bizonyult aktívknak. A Ca^{2+} -homeosztázis másik fontos eleme, a plazmamembrán purinerg P2X₇, Ca^{2+} -csatornája mind melanociták, mind melanómasejtek esetén overexpressziót mutatott, azonban az áramlási vizsgálatok szerint ez a csatorna csak a melanómasejtekben funkcionált teljesértékűen.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Humán melanóma-sejtvonalak esetén a rövid cukorláncú heparinszármazékok képesek-e interferálni az extracelluláris mátrix heparánszulfát csoportjaival, és ezzel befolyásolható-e a sejtek migrációkészsége?
2. Humán malignus melanóma milyen formában expresszálja a hepatocita növekedési faktor receptorát, a c-Met-et, és mi a c-Met fehérje *in vitro* és *in vivo* szerepe a sejtproliferáció, az apoptózis, a migráció és az invázió folyamataiban?
3. Humán malignus melanóma milyen formában fejezi ki az epidermális növekedési faktor receptorát (EGFR), valamint mi annak szerepe a sejtproliferáció, az apoptózis, a migráció és az invázió szabályozásában?
4. Milyen szerepe van humán malignus melanóma sejtvonalak túlélésében a Ca^{2+} -jelátviteli útnak?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Emberi melanóma-sejtvonalakon immuntechnikákat alkalmazva vizsgáltuk az EGFR és a c-Met különböző szakaszainak expresszióját és tirozinkináz-aktivitását (immuncitokémia, áramlási citométer, Western-blot). Specifikus gátlószerek, si-RNS-sel való transzfekció és oligoszacharid heparinfragmensek hatását vizsgáltuk a sejtek *in vitro* tulajdonságaira (proliferáció: MTT-teszt; migráció: Boyden-kamra; invázió: Boyden-kamra ECM-bevont membrán alkalmazásával).

Propidium-jodidos festéssel, illetve Annexin V és propidium-jodid kettős jelöléssel és áramlási citométerrel detektáltuk a kezelőszerek apoptózisindukációs hatását.

Különböző *in vivo* kísérleti összeállításokban SCID egerekben vizsgáltuk az egyes kezelőszerek melanómasejtek áttétképzésére és kolonizációképességére kifejtett hatását (lép-máj metasztázis modell, tüdőkolonizációs modell).

EREDMÉNYEK

Preklinikai vizsgálatainkban a 4–18 monomerből álló oligoszacharid heparinszármazékok gátolták humán melanómasejtek *in vitro* sejtmigrációját és invázióját, ezzel szemben proliferációgátló hatásúnak csak a 18 monomerből álló dp18 oligoszacharid bizonyult. Az oligoszacharid heparinfragmensek kikapcsolták a CD44v3 humán melanómasejtek migrációjára és inváziójára gyakorolt indukciós hatását. SCID egerekkel végzett állatkísérletes *in vivo* modellben humán melanómasejtek tüdőkolonizációját gátolta a 4, illetve a 18 egységből álló oligoszacharid, míg az *in vitro* kísérletekben hatástalan dp22 ebből a biológiai aspektusból sem eredményezett változást. A tüdőkolóniákból készült szövet-

tani metszetek fénymikroszkóppal való elemzésének segítségével kimutattuk, hogy a dp18 oligoszacharid szignifikáns mértékben csökkentette a melanómás kolóniák mikroszkópos méretét, ami összhangban van a dp18 *in vitro* tapasztalt proliferációgátló hatásával. A dp4 és a dp22 nem befolyásolta szignifikáns mértékben a tumorkolóniák méretét. A kezelés hatására a tumorkolóniák szöveti szerkezetében nem tapasztaltunk változást. Mivel irodalmi adatok szerint a hat, illetve annál rövidebb lánchosszú oligoszacharidok antikoagulációs hatása minimális, ezért ennek a vegyülets csoportnak a kolonizációgátló hatása felveti a malignus melanóma terápiájában történő alkalmazás lehetőségét anélkül, hogy számolni kellene a hemosztázisra gyakorolt mellékhatásokkal.

Munkacsoportunk RNS-szintű vizsgálataira alapozva áramlási citométerrel és immunfluoreszcens eljárás segítségével vizsgáltuk meg humán melanómasejtekben az EGFR és a c-Met fehérjeszintű expresszióját. A melanómasejtek expresszálták a c-Met fehérje intracelluláris és extracelluláris részét, azonban az EGFR esetén a külső régió elleni antitest (egy sejtvonal kivételével) minden esetben negatívnak bizonyult. Permeabilizált sejteken az EGFR intracelluláris doménjét minden vizsgált sejtvonal esetén detektáltuk. Foszfospecifikus antitest segítségével bizonyítottuk, hogy exogén ligandum hiányában mind az EGFR, mind a c-Met konstitutív aktivitást mutat. Monospecifikus tirozinkináz-gátló kezeléssel mind a c-Met, mind az EGFR aktivitása gátlható volt. A specifikus gátlás c-Met esetén idő- és koncentrációfüggőnek bizonyult. A receptoraktivitás mind kis molekulásúlyú tirozinkináz-gátlók, mind si-RNS-transzfekció segítségével történt gátlása a melanómasejtek *in vitro* proliferációjának és migrációjának csökkenésében nyilvánult meg. Az EGFR-t és a c-Met-et célzó tirozinkináz-gátlás az egyébként nehezen apoptózisba hozható melanómasejtekben jelentős mértékű apoptózist indukált. SCID egerekben végzett állatkísérletes *in vivo* lép-máj xenograft modellben mind az EGFR-t, mind a c-Met-et gátló monospecifikus kezelés következtében a májban szignifikánsan kevesebb áttét alakult ki. Mivel a kettős specificitást mutató, EGFR-re és c-Met-re egyaránt ható tirozinkináz-gátló minden vizsgált biológiai paraméter (proliferáció, migráció, apoptózisindukció, áttétképzés) esetén a monospecifikus kezelésnél hatásosabbnak bizonyult, felmerül malignus melanóma esetén a több célpontra ható szerek fejlesztésének szükségessége.

A tirozinkináz jelpályában számos jelátviteli molekula, főként kis G-fehérje érintett, melyen keresztül érvényesül a Ca^{2+} szabályozó szerepe. A ligandfüggő P2X₇ purinerg kalciumcsatorna ATP-vel való aktiválása önmagában humán melanómasejtekben nem indukált apoptózist, ugyanakkor csökkentette a 2-metoxi-ösztradiol következtében kialakuló apoptózis mértékét. Ezzel szemben a P2X₇ expressziójának specifikus si-RNS-sel történő gátlása növelte a humán

melanomasejtek 2-metoxi-ösztadiol kezelésre kialakuló apoptotikus frakcióját. Humán melanomasejteken végzett, a P2X₇ ligandfüggő Ca²⁺-csatorna expressziós státuszát és rendellenes működését célzó kísérletes munkánk segíthet az apoptózisrezisztencia molekuláris mechanizmusának megértésében, valamint hatásosabb gyógyszerek fejlesztésében.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Azonosítottuk humán melanomasejtek esetén az LMWH 4–18 hosszúságú oligoszacharid-származékait, melyek antiproliferációs és/vagy antimigrációs, valamint kolonizációgátló hatással rendelkeznek. Strukturális szempontból definiáltuk a biológiai hatás eléréséhez szükséges szekvenciát.
2. A vad típusú c-Met humán malignus melanomasejtekben exogén HGF nélkül konstitutív aktivitást mutatott. A c-Met funkcionális gátlása szelektív tirozinkináz-inhibitorral humán melanomasejtek esetén gátolta az *in vitro* proliferációt és a migrációt, apoptózist indukált, és állatkísérletes *in vivo* modellben visszafogta mind a primer tumor növekedését, mind a metasztázisképzést.
3. Igazoltuk, hogy humán melanóma-sejtvonalaink többségében az EGFR konstitutív aktivitást mutatott. Ennek megfelelően a melanomasejtek érzékenyen reagáltak a szelektív EGFR-gátló kezelésre: a kezelőszer gátolta az *in vitro* proliferációt és a migrációt, apoptózist indukált, és állatkísérletes *in vivo* modellben csökkentette a metasztázisképződést. Eredményeink felvetik a valódi kettős célponttal (c-Met és EGFR) rendelkező tirozinkináz-gátlók fejlesztésének szükségességét.
4. Igazoltuk, hogy humán malignus melanóma sejtvonalak esetén a Ca²⁺-homeosztázisban szerepet játszó P2X₇ purinoreceptor anti-apoptotikus hatású.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Tóvári Józsefnek, és szenior témavezetőmnek, Prof. Dr. Timár Józsefnek a 2003 végétől kezdődő folyamatos támogatásukért, tanácsaikért és ötleteikért, hogy létrejöhessen ez az értekezés.

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet Tumor Progressziós Osztályának, illetve a „Metasztázis Munkacsoport” tagjainak a segítségét. A minősített kutatók közül Dr. Ladányi Andrea jobbító szándékú szakmai és nyelvi kritikáival, korrektúráival, illetve a laborrend betartásának szeretetére való nevelésével mozdított előre; Dr. Rásó Erzsébet a molekuláris biológiai vizsgálatok alapjait adta; Dr. Döme Balázs az újabb és újabb cikkek írása során állított mindig kihívások elé; Dr. Hegedűs Balázs értekezésem házi bírálója, és talán legnagyobb kritikusom volt; Dr. Dobos Judit kiváló PhD-s társam, akire mindig lehetett számítani. Dr. Rásó-Barnett Lívia a melanómavonalak RNS-szintű EGFR-expressziójának analízisét végezte el; Ádám Attila és Keszthelyi Magdolna a c-Met molekuláris biológiai elemzésével segítette elő munkám; Berta Judit az SU11274 kezelőszerrel való apoptózisindukációs kísérletben nyújtott segítséget. Köszönetem fejezem ki osztályunk mára már

végzett TDK-s hallgatóinak: Dr. Kramer Zsófiának, Dr. Simon Erikának, Futosi Krisztinának és Dr. Horváth Lászlónak. A heparinszármazékokkal végzett vizsgálat kiindulópontját Dr. Bereczky Biborka munkája jelentette. A szövettani metszetekről készített fényképek Kónya Miklós munkáját dicsérik. Külön köszönet illeti asszisztenseinket, Parragné Derecskei Katalint és Sinka Andrásné (Ibolyát) áldozatos és szakszerű munkájukért, mely számomra pótolhatatlan segítséget jelentett.

Dr. Deli Tamás és Varga Norbert a kalciumos témakörben voltak társ-szerzőim. Köszönöm a velünk együttműködő kutatótársaknak: Prof. Dr. John T. Gallagher és munkacsoportja az oligoszacharidokat állította elő; Prof. Dr. Kéri György és munkacsoportja az EKB569 és SU11274 tirozinkináz-gátlók szintézisét végezte el; Prof. Dr. Erdődi Ferenc és Dr. Kiss Andrea a proteinfoszfatáz-vizsgálatot kivitelezte; Dr. Barna Gábor az Annexin V és propidium-jodidos kettős jelölést elemezte áramlási citométerrel; a Western-blothoz Michael Mildner nyújtott segítséget.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájával kapcsolatos közlemények

1. Kenessey I, Simon E, Futosi K, et al. Antimigratory and antimetastatic effect of heparin-derived 4-18 unit oligosaccharides in a preclinical human melanoma metastasis model. *Thromb Haemost* 102:1265–1273, 2009
2. Deli T*, Varga N*, Ádám A*, Kenessey I*, et al. Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer* 121:55–65, 2007 (A *-gal megjelölt szerzők egyenértékűnek számítanak.)
3. Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, et al. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets* 10:332–342, 2010

Az értekezés témájától független közlemények

1. Bauer PI, Chen HJ, Kénesi E, et al. Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett* 506:239–242, 2001
2. Rényi-Vámos F, Tóvári J, Fillinger J, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11:7344–7353, 2005
3. Döme B, Timár J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7341–7347, 2006
4. Lövey J, Bereczky B, Gilly R, et al. Recombinant human erythropoietin alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels. *Strahlenther Onkol* 184:1–7, 2008
5. Döme P, Teleki Z, Rihmer Z, et al. Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Mol Psychiatry* 14:523–531, 2009
6. Bogos K, Rényi-Vámos F, Dobos J, et al. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:1741–1746, 2009
7. Harisi R, Kenessey I, Oláh JN, et al. Differential inhibition of single and cluster type tumor cell migration. *Anticancer Res* 29:2981–2985, 2009
8. Jeney A, Kenessey I, Timár F, et al. A tumorok áttétképzését korlátozó hatóanyagok kutatása. *Magyar Onkológia* 50:93–100, 2006
9. Lövey J, Kenessey I, Rásó E, et al. A rekombináns humán erythropoietin-a fokozza a humán laphámrák sugárérzékenységét preklinikai modellben. *Magyar Onkológia* 51:53–61, 2007
10. Kulka J, Tökés AM, Tóth AI, et al. Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immunhisztokémiai fenotípus tükrében. *Magyar Onkológia* 53:335–343, 2009