

Humán daganatsejtek migrációjának és proliferációjának onkogénfüggő szabályozása

GARAY M. TAMÁS

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Budapest

TÉMAVEZETŐ: HEGEDŰS BALÁZS PHD

Levezetési cím:

Garay M. Tamás, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet,
1091 Budapest, Üllői út 93. Telefon: 459-1500/53522,
e-mail: garay.tamas@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2015. január 23.

Elfogadva:

2015. március 28.

A szolid tumorok nagy mortalitása elsősorban inváziós és áttétképző képességüknek tulajdonítható. E folyamatok alapvetően függenek a sejtmozgás és sejtosztódás szabályozásától. A sejtmozgást és sejtosztódást befolyásoló növekedési faktor- (GF) receptor jelátviteli útvonalak onkogén mutációi mind a tumorok kialakulásában, mind célzott terápiájukban meghatározóak. Videomikroszkópos kísérleteink során szignifikáns pozitív korrelációt találtunk sejtmozgás és sejtosztódás között melanóma- és tüdőráksejteken, így a „go or grow” hipotézist nem sikerült megerősíteni. Továbbá bemutattuk, hogy kollagéngélbe ágyazott agydaganatsejtek sferoidjainak inváziója a proliferáció gátlása mellett is bekövetkezik. A melanómasejtek EGF- és FGF2-kezeléssel szemben mutatott érzékenysége függött a BRAF és NRAS gének mutációjától, ezzel szemben a GF-receptorok tirozinkináz-aktivitásának gátlása nem mutatott mutációfüggést. A prenilációgátlás a BRAF-mutáns/PTEN-vad sejtek kivételével csökkentette a melanómasejtek kolóniaképző képességét, ugyanakkor *in vitro* növelte a migrációt BRAF-mutáns és *in vivo* az áttétképző képességet dupla vad típusú melanómasejteken. Az aktivin-jelátvitel (TGF- β fehérjecsald) gátlása csökkent osztódást, serkentése megnövekedett migrációt okozott mesotheliómasejteken, így az aktivin-jelátvitel ígéretes célpontja lehet célzott terápiás beavatkozásoknak. Összefoglalva elmondható, hogy a tumorsejtek osztódása sem nem akadály, sem nem előfeltétele a sejtek migrációjának és inváziójának. Továbbá igazoltuk, a különböző onkogén mutációk eltérően befolyásolhatják a tumorsejtek migrációját és proliferációját. Mindazonáltal ígéretes támadáspontjai lehetnek célzott terápiáknak, ugyanakkor nagymértékben befolyásolhatják azok hatását. Magyar Onkológia 60:339–342, 2016

Kulcsszavak: proliferáció, migráció, növekedési faktor receptor jelátvitel, „go-or-grow” hipotézis

The high mortality of solid tumors can be attributed to their invasive and metastatic potential that is based on their migration and proliferation. Importantly, growth factor receptor (GF) signaling pathways regulating proliferation and migration are often affected by oncogenic mutations and are important targets for antitumor therapy. We found positive correlation between migration and proliferation in melanoma and lung cancer cells using videomicroscopy, not supporting the “go or grow” hypothesis. Furthermore, the invasion into collagen I matrices from brain tumor spheroids was not impaired upon the inhibition of proliferation. Sensitivity of human melanoma cells towards EGF and FGF2 treatment but not against GF receptor tyrosine kinase inhibitors was oncogenic BRAF or NRAS mutation status dependent. Prenylation inhibition failed to decrease clonogenic growth in BRAF mutant but PTEN wild-type melanoma lines but increased migration in BRAF-mutant cells. In certain mesothelioma cells, activin signaling showed a pro-tumorigenic effect suggesting activin as a valuable candidate for therapeutic interference. In summary, our findings demonstrate that proliferation is neither an obstacle nor a prerequisite for tumor cell invasion. Furthermore, the specific oncogenic mutations may differentially regulate migration and proliferation of tumor cells. Therefore, they are not only therapeutic targets but can also profoundly influence the efficacy of various therapies.

Garay MT. Oncogen dependent regulation of the migration and proliferation of human tumor cells. *Hungarian Oncology* 59:339–342, 2016

Keywords: proliferation, migration, growth factor receptor signaling, “go or grow” hypothesis

BEVEZETÉS

Az egyre gyakrabban előforduló daganatos megbetegedések többségében nem az elsődleges daganat, hanem a távoli áttétek kialakulása miatt végzetes a betegség. Az áttétek kialakulása során szükséges a sejtek adhéziójának, osztódásának és mozgásának időbeli és térbeli összehangolása. Ennek az összehangoltságnak az egyik aspektusát írja le a „go or grow” hipotézis, mely posztulálja, hogy a sejt migrációja és proliferációja egymást kizáró folyamatok, és a tumorsejtek késleltetik az osztódást a migráció érdekében. Ha ez így van, akkor a vándorló tumorsejtek kisebb érzékenységet mutathatnak azokkal a kezelésekkel szemben, melyek a proliferációt gátolják. Továbbá a proliferációt gátló terápiák alkalmazása során kiválogatódhatnak nagyobb migrációs képességű sejtek, valamint fokozódhat a sejtmozgás a túlélő sejtpopulációkban. Ugyanakkor a migráció gátlása osztódást indukálhat a vándorló sejtekben, ami az elsődleges vagy áttéti tumor növekedéséhez vezethet. Ezen okok miatt a sejtosztódás és sejtmozgás közötti kapcsolat mélyebb megismerése elengedhetetlen a mindkét folyamatot gátló terápiák kifejlesztéséhez. A „go or grow” hipotézist neuroektodermális, mezodermális és entodermális eredetű sejtvonalakon vizsgáltuk.

Napjainkban a különböző rákellenes terápiák a proliferáció és migráció gátlásához gyakran veszik célba a különböző növekedési faktor (GF) jelátviteli útvonalakat, melyek sok esetben átfednek, például a Ras és Raf fehérjék mind az EGF-, mind az FGF2-szignalizációban központi szerepet játszanak. Fokozott EGF- és FGFR-jelátvitel mind a receptorok, mind a jelátviteli kaszkád elemeinek mutációi (NRAS: 10–30%; BRAF: 40–70%) révén meghatározóak a melanóma esetében. Az EGF/FGFR szignalizáció gátlása megvalósítható mind a receptorok, mind a jelátvitel alsóbb szintjein is. Ez történik a zoledronsavval történő kezelés esetében is, ami a Ras egyik fehérjeszintézis utáni módosítását, a prenilációt gátolja. Mivel az EGF és az FGF2 jelentősen átfedő jelátviteli hálózatokon hatnak, valamint a melanómában található onkogén mutációk legnagyobb része ezeket érinti, munkánk során az EGF- és FGF2-szignalizáció aktivációjára és gátlására adott választ vizsgáltuk különböző NRAS- és BRAF-mutációt hordozó melanómasejtekben.

Az aktivin fehérje a TGF- β jelátviteli rendszer egyik eleme. Ertérő eredetű daganatokban az aktivin szignalizációja a sejtosztódás és tumorprogresszió gátlására és fokozására is képes lehet. Egy gátlószer (SB-431542) képes az aktivin mindhárom I-es típusú receptorát gátolni. Mivel az aktivin daganatserkentő hatással bír számos mellüregi daganatban, valamint a malignus pleurális mezotelióma ellen nem létezik még célzott terápia, kísérleteinkben az aktivinszignalizáció gátlását vizsgáltuk humán mezoteliómasejteken.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A „go or grow” hipotézis vizsgálata – tüdődaganat-, melanóma- és mezotelióma-sejtvonalak proliferációjának, migrációjának és citokinézise időtartamának, valamint ezek korrelációinak vizsgálata.

2. 3D multicelluláris tumorsejtszferoidok kollagéngélben történő inváziójának vizsgálata proliferációt megengedő és nem megengedő körülmények között.

3. Meghatározni az onkogén BRAF- és NRAS-mutációknak az EGFR és FGFR aktivációjára, illetve gátlására gyakorolt hatását melanómasejteken.

4. A prenilációgátlás hatásának vizsgálata az onkogén BRAF- és NRAS-mutációk függvényében *in vivo* és *in vitro* melanómamodellben.

5. Az aktivinszignalizáció tumorserkentő vagy -gátló hatásának vizsgálata mezoteliómasejteken.

MÓDSZEREK

Tizenhárom melanóma-, tizenkét mezotelióma-, tíz tüdődaganat- és két agytumor-eredetű sejtvonal 2 és 3D sejttenyészeit vizsgáltuk kísérleteink során. A sejtek proliferációjának, migrációjának és a citokinézis időtartamának mérését fáziskontraszt videomikroszkópos felvételek elemzésével végeztük el. Gliómasejtek 3D szferoidjait ágyasztuk kollagéngélbe, majd vizsgáltuk a sejtek inváziós mintázatának proliferációfüggését. A melanómasejtek BRAF- és NRAS-mutációs státuszát mikrokapilláris restriktív fragmens hossz analízis és DNS-szekvenálás segítségével határoztuk meg. Az EGFR és FGFR expresszióját kvantitatív valós idejű PCR segítségével mértük meg. Kísérleteink során EGF-, FGF2- és FGFR-gátlószer (ponatinib, BGJ-398, BIBF-1120, AZD-4547); EGFR-gátlószer (gefitinib, erlotinib, CI-1033, pelitinib); zoledronsav (ZA); aktivin- és aktivinreceptor-inhibitor (SB-431542) kezeléseket alkalmaztunk. A tumorsejtek életképességét SRB-, apoptózist TUNEL-festéssel határoztuk meg. A kezelések jelátviteli hálózatra gyakorolt hatását az Erk1/2 és S6 fehérjék foszforilációjának immunoblot analízisével vizsgáltuk. A ZA *in vivo* hatásainak vizsgálatára szubkután tumornövekedés és lép-máj metasztázis modellt alkalmaztunk NSG egerekben.

EREDMÉNYEK

A sejtmozgás és osztódás összefüggése sejtkultúrákban
Videomikroszkópos felvételek elemzésével vizsgáltuk a migrációt, proliferációt és a citokinézishosszt mind az egyedi sejtek, mind populációik szintjén 35 különböző – 12 mezotelióma-, 13 melanóma- és 10 tüdőrák-eredetű – sejtvonal kétdimenziós tenyészetében. A 24 óra alatt mért átlagos eltávolodás szignifikánsan nagyobbak bizonyult mezotelióma-sejtvonalakban a melanómából vagy tüdőrákból származó sejtekhez képest. A 24 óra alatti osztódások várható értékében és a citokinézis átlagos időtartamában nem találtunk szignifikáns különbséget a tumortípusok között.

A mért paraméterek közti korrelációt vizsgálva pozitív korrelációt találtunk a sejtosztódás és sejtmozgás között melanóma- és tüdőráksejtvonalakban, míg mezoteliómában nem volt korreláció. A citokinézis időtartama és a migráció között szignifikáns negatív korrelációt találtunk melanóma

esetében. A proliferáció és a citokinézis időtartama között csak mezoteliómasejtek esetében volt szignifikáns korreláció.

Mivel bizonyos modellek a proliferációt előfeltételnek tekintik a daganatsejtek környező kötőszövetbe vándorlásához, megvizsgáltuk a sejtosztódás és a gélinvázio közötti összefüggést glioblasztómasejtek 3D-s tenyészeiben. Az invázio mintázatok, illetve a mért migrációs távolságok nem változtak a proliferációt gátló kezelést követő első 24 órában. Eredményeink alapjául szolgáltak egy, az extracelluláris mátrixba irányuló sejtinvázio mintázatát leíró matematikai modellnek.

Az EGFR- és FGFR-jelpálya mutációfüggő aktivációja melanómában

A kísérleteink során használt melanóma-sejtvonalak közül négy sejtvonalban találtunk BRAF- (V600E), két sejtvonalban NRAS- (Q61K és Q61R) mutációt mikrokapilláris restriktív fragmens hossz analízis és DNS-szekvenálás során, míg további két sejtvonal eme génekre nézve vad típusú volt. Az EGFR és FGFR gének GAPDH-hoz viszonyított kifejeződését qPCR alkalmazásával vizsgálva megállapítottuk, hogy mindegyik vizsgált sejtvonalban az EGFR, FGFR1 és FGFR4 jelentős mértékben termelődik. Érdekeség, hogy FGFR2- és FGFR3-transzkripciót nem találtunk a két NRAS-mutáns sejtvonalban. Elmondható, hogy a növekedési faktorok receptorainak kifejeződése a kettős vad típusú sejtekben volt a legalacsonyabb.

Fokozott migrációval és proliferációval járt együtt mind a BRAF, mind az NRAS aktiváló mutációja a kettős vad típusú sejtekhez képest, kontrollkörülmények között. Ugyanakkor az 50 ng/ml EGF- és/vagy FGF2-kezelés hatására csak a kettős vad típusú sejtek esetében volt tapasztalható a proliferáció mérsékelt fokozódása. A migrációra gyakorolt hatás jelentősebb volt a proliferációban bekövetkezett változásokhoz képest, és a hatás szintén csak a kettős vad típusú sejteken volt látható.

A növekedési faktorok jelpályáinak két fontos effektora az Erk1/2 és az S6 fehérjék. Ezek foszforiláció általi aktivációját immunblot módszerrel vizsgálva megállapítottuk, hogy a BRAF- és NRAS-mutációk nagyobb mértékű Erk1/2- és S6-alapaktivitással járnak. A növekedési faktorok hatására a kettős vad sejtekben sokkal nagyobb mértékben nőtt az Erk1/2 és S6 foszforilációja, mint a BRAF- vagy NRAS-mutáns sejtekben. Elmondható, hogy kezelés hatására ezen onkogén mutációt hordozó sejtekben az Erk1/2 és S6 foszforilációjának szintje alig változott a kettős vad sejtvonalakhoz képest.

Az EGFR- és FGFR-jelpálya mutációfüggő gátlása melanómában

Az EGFR- és FGFR-jelátvitel receptorszinten történő gátlásának mutációfüggését a sejtvonalak 72 órán át tartó EGFR-inhibitor (gefitinib, erlotinib, CI-1033 és pelitinib) és FGFR-inhibitor (ponatinib, BGJ-389, BIBF-1120 és AZD-4745) kezelést követő SRB-festéssel vizsgáltuk. Bár a CI-1033 és

a pelitinib alkalmazása hatékonyabbnak bizonyult a gefitinib- és erlotinibkezeléshez képest, egyik EGFR-gátló sem mutatott mutációktól függő hatást. Hasonlóképpen az FGFR gátlószereinek a sejtek életképességére gyakorolt hatása is függetlennek mutatkozott a sejtek BRAF- és NRAS-mutációs státuszától.

Az EGFR- és FGFR-jelátvitel részben gátlható a jelátvitelben szereplő Ras fehérje posztttranszlációs módosulásainak – prenilációjának – gátlása révén. Ezért vizsgáltuk a prenilációgátlás hatássóságát NRAS-mutáns, BRAF-mutációt önmagában, vagy a PI3K-út vonal aktiválódását elősegítő PTEN-delécióval együtt hordozó, illetve mind BRAF-, mind NRAS-génre vad típusú melanóma-sejtvonalakban. Az NRAS-mutáns sejtek életképességét a 72 órás ZA-kezelés egyértelműen csökkentette még alacsony koncentrációk alkalmazása esetén is, ugyanakkor a BRAF-mutáns és a kettős vad sejtekben magasabb koncentrációk hatására is csak kisebb mértékű csökkenést lehetett megfigyelni. A 10 napig tartó kezelés mellett csak a BRAF-mutáns/PTEN-vad sejtek kolóniaképző képessége nem csökkent jelentős mértékben. Videomikroszkópos vizsgálataink során BRAF-mutáns sejtvonalakban a ZA-kezelés nagyobb mértékben növelte a sejtek migrációs aktivitását, mint a nem BRAF-mutáns sejtvonalak esetében. A TUNEL-festés alkalmazásával kapott, az apoptotikus sejtek számára vonatkozó eredményeink egybevágtak az életképességi vizsgálatok eredményeivel.

A ZA *in vivo* hatását szubkután tumornövekedési és lép-máj kolonizációs tumormodellekben vizsgáltuk NSG egerekben. A ZA 50, illetve 500 µg/kg dózisban nem gátolta a szubkután tumorok növekedését. Az áttétképzések gátlása sem volt jelentős mértékű az alkalmazott ZA-kezelés hatására. Ugyanakkor meglepő módon a ZA alacsonyabb koncentrációban (50 µg/kg) alkalmazva szignifikánsan növelte az áttétképződést kettős vad típusú sejtvonalak esetén.

Az aktív jelátviteli út befolyásolása mezoteliómában

Az aktív-jelátvitel aktiválása bizonyos mellüregi tumorokban fokozza a tumorok progresszióját, ugyanakkor a jelátvitel mezoteliómában játszott szerepére vonatkozóan korábban nem történt vizsgálat. Az aktív A (20 ng/ml), az SB-431542 aktív receptor-inhibitor (20 µM) és ezek kombinációjának proliferációra és sejtmozgásra gyakorolt hatását vizsgáltuk videomikroszkópos módszerrel mezoteliómasejteken. Az SB-431542 önmagában vagy kombinációban alkalmazva az M38K mezoteliómasejtek proliferációját csökkentette, ugyanakkor aktív kezelés hatására a sejtek migrációs aktivitása növekedett. A P31 mezotelióma-sejtvonal sem az aktív-jelátvitel gátlására, sem serkentésére nem mutatott érzékenységet. A videomikroszkópia kivételes lehetőséget biztosít a rendelkezésére álló citokinézisek azonosítására. A P31 mezotelióma-sejtvonal sejteiben az aktív receptorokat gátló SB-431542 önmagában vagy kombinációban történő alkalmazása a kontrollhoz (2%) képest szignifikánsan magasabb arányú (7-8%) multipoláris, többségében hárompolusú sejtosztódáshoz vezetett.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Eredményeink nem támasztják alá a „go or grow” hipotézist, mivel nem sikerült negatív korrelációt kimutatni a sejt migráció és a proliferáció között. A korreláció melanómából és tüdőrákból származó sejtek esetében pozitív volt.

2. Kollagénbe ágyazott multicelluláris gliómaszferoidok esetében kimutattuk, hogy a mátrix inváziójának nem előfeltétele a proliferáció.

3. A mutációs státusztól függő EGF- és FGF-válasz vizsgálatánál alacsonyabb migrációs és proliferációs alapaktivitást és magasabb indukálhatóságot mutattunk ki dupla vad melanómasejteken, mint onkogén NRAS- vagy BRAF-mutáns melanómákon. Ezzel szemben a GF-receptor tirozinkináz-inhibitorok az onkogén mutációtól független hatást mutattak.

4. A preniláció gátlása a proliferáció csökkenését és apoptózis indukcióját okozta a BRAF-mutáns/PTEN-vad sejtek kivételével az összes vizsgált melanóma-sejtvonal esetében. Továbbá a sejtmozgás növekedését eredményezte a BRAF-mutáns sejtek esetében *in vitro*. Dupla vad sejtek esetében alacsony dózisz kezelés mellett az áttétképzés növekedését tapasztaltunk *in vivo*. Eredményeink alapján az NRAS-mutáns melanómának a zoledronsav megfelelő terápiája lehet, ugyanakkor a BRAF-mutáns esetekben a PTEN-státusz jelentősen befolyásolhatja a ZA-kezelés kimenetelét.

5. Mezeteliómák esetében az aktivinszignalizáció dagatnatserkentő hatással bír. Az eredmények alapján az aktivin hatékony terápiás célpont lehet a mezotelióma kezelésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször témavezetőmnek, Hegedűs Baláznak szeretnék köszönetet mondani, aki a kezdetektől vezette lépéseimet. Hálával tartozom Tímár Józsefnek, a II. Sz. Patológiai Intézet vezetőjének, aki támogatta kutatásaimat és segítette munkámat. Köszönettel tartozom továbbá a II. Sz. Patológiai Intézet munkatársainak, elsősorban Molnár Eszternek és Juhász Évának. Továbbá köszönettel tartozom mindazoknak, akikkel lehetőségem volt együtt dolgozni a Bécsi Orvostudományi Egyetem Rákkutató Intézetében, az Oslói Egyetemi Kórház Rákkutató Intézetének Tumorbiológiai Osztályán, az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézetben, az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályán, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biofizika Tanszékén, a University of Kansas Medical Center Anatómiai és Sejtbiológiai Tanszékén és a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkasebészeti Tanszékén. Végül, hálával tartozom családomnak, különösen feleségemnek, aki engedte, hogy messzire utazzam, korántól későig dolgozzam és bátorított, ha nem ideálisan alakultak a dolgok.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- Laszlo V, Hoda MA, Garay T, et al. Epigenetic down-regulation of integrin $\alpha 7$ increases migratory potential and confers poor prognosis in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol* 237:203-214, 2015
- Garay T, Molnár E, Juhász É, et al. Sensitivity of melanoma cells to EGFR and FGFR activation but not inhibition is influenced by oncogenic BRAF and NRAS mutations. *Pathol Oncol Res* 21:957-968, 2015
- Garay T, Kenessey I, Molnár E, et al. Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PLoS One* 10:e0117021, 2015
- Schelch K, Hoda MA, Klikovits T, et al. FGF receptor inhibition is active against mesothelioma and synergizes with radio- and chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med* 190:763-772, 2014
- Berta J, Hoda MA, Laszlo V, et al. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* 5:4426-4437, 2014
- Lötsch D, Steiner E, Holzmann K, et al. Major vault protein supports glioblastoma aggressiveness via stabilization of EGFR/PI3K-mediated survival and migration signals. *Oncotarget* 4:1904-1918, 2013
- Garay T, Juhász É, Molnár E, et al. Cell migration or cytokinesis and proliferation? – Revisiting the „go or grow” hypothesis in cancer cells *in vitro*. *Exp Cell Res* 319:3094-3103, 2013
- Hoda MA, Münzker J, Ghanim B, et al. Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *Br J Cancer* 107:1978-1986, 2012
- Szabó A, Varga K, Garay T, et al. Invasion from a cell aggregate – the roles of active cell motion and mechanical equilibrium. *Phys Biol* 9:016010, 2012
- Illyés Z, Halász K, Rudnóy S, et al. Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. *J Appl Bot Food Qual* 83:28-36, 2009
- Todorovics C, Garay T, Bratek Z, et al. The use of the reed (*Phragmites australis*) in wastewater treatment on constructed wetlands. *Acta Biologica Szegediensis* 49:81-83, 2005