

A melanoma lehetséges terápiás célpontjainak vizsgálata: az NF- κ B jelátviteli útvonal gátlása és a melanoma sejtek termelte exoszómák immunmoduláló hatásának vizsgálata

Ph.D. értekezés tézisei

Marton Annamária

Témavezetők

Vizler Csaba, Ph.D.
tudományos főmunkatárs

Buzás Krisztina, Ph.D.
tudományos munkatárs

***Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar***

***Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet***

**Szeged
2016**

Bevezetés

A rosszindulatú daganatok kialakulásához a ma elfogadott modell szerint számos genetikai változás vezet. Ilyen például a növekedési faktoroktól való függetlenedés, a kontakt gátlás megszűnése, a programozott sejthalál hibás működése, a genetikai stabilitás elvesztése, az angiogenezis, invázió és áttétképzés. Mivel a malignus állapot kialakulásához számos genetikai elváltozás szükséges, a daganatok előbb-utóbb óhatatlanul az immunrendszer „látókörébe” kerülnek, ezért túlélésükhöz az immunválasz modulálására van szükség.

A nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) jelátviteli út meghatározó szerepet játszik a daganatos megbetegedésekben. Fokozott aktivitása több tumor esetében megfigyelhető, és kapcsolatba hozható a daganatképzés különböző lépéseivel. Kemoterápia hatására tovább emelkedhet az NF- κ B aktivitás, amely megvédheti a daganatos sejteket a kemoterápia indukálta sejthaláltól.

A daganatok kialakulásának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni rezisztenciájának fontos komponense a tumor-gazda kommunikáció és a megváltozott tumor mikrokörnyezet. Ennek fontos mediátorai a tumorok által kibocsátott exoszómák. Az exoszómák 20-100 nm átmérőjű mikrovezikulák, melyeket minden emlős sejt -beleértve a tumor sejteket is - képes kibocsátani. Az exoszómák endoszómális eredetűek; exocitózissal kerülnek ki a sejtéből. Hatásuk sokféle lehet; a hordozott fehérjék, receptorok, transzkripciós faktorok, mRNS-ek és miRNS-ek révén befolyásolhatják a célsejtek működését. A tumorsejtek által kibocsátott exoszómák immunmoduláló szerepe még nem teljesen tisztázott. A tumor fejlődési stádiumától és az exoszómák típusától függően mind aktiváló, mind gátló hatásokról beszámol a szakirodalom. Az exoszómák által átvitt információ befolyásolja a tumor sejtek migrációját, az apoptózist, az antigén-specifikus T sejt választ, megváltoztatja a sejtek polaritását.

A melanoma a melanocitákból kialakuló rosszindulatú, invazív bőrdaganat; nagy valószínűséggel képez áttéteket, genetikai variabilitása még a többi tumorhoz képest is magas, és hatékonyan kerüli el az immunválaszt. Mindezek pontos mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. Egyik lehetséges oka, hogy a melanoma sejtekben az NF- κ B jelátviteli útvonal folyamatosan aktív, melynek hatására anti-apoptotikus, angiogenezisben szerepet játszó és a migrációt segítő fehérjék termelődnek. Egy másik lehetséges magyarázat a melanoma sejtek exoszóma termelése. A tumor sejtek által kibocsátott exoszómák megváltoztathatják a tumor mikrokörnyezetében lévő sejtek fenotípusát, így hozzájárulhatnak, többek között, az

immunrendszer felügyeletének elkerüléséhez. A kemoterápia az NF- κ B szignálút aktiválása mellett az exoszóma termelés fokozódásához is vezet.

Célkitűzések

Mivel az NF- κ B jelátviteli út vonal komplex szerepet játszik a daganatok kialakulásában - növeli a daganatok invazivitását, fokozza az áttétképzést, továbbá egyik mediátora a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának -, munkám első felében a potenciális NF- κ B gátló vegyületeket vizsgáltunk. Céljaink a következők voltak:

- A vanillinnek és kilenc analógjának az A375 humán melanoma sejtek proliferációjára és NF- κ B jelátviteli útvonalra gyakorolt hatásainak vizsgálata.
- A doxorubicin és ciklofoszfamid konvencionális kemoterápiás szerekkel és vanillinnel történő kombinált kezelések hatásának vizsgálata melanoma sejteken *in vitro*.
- Az *in vitro* eredmények alapján leghatásosabbnak talált vanillin analógok tumorelles hatásának vizsgálata xenograft modellben.

A daganatok kialakulásának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni rezisztenciájának fontos komponense a tumor-gazda kommunikáció és a megváltozott tumor mikrokörnyezet. Ennek fontos mediátorai a tumorok által kibocsátott exoszómák.

Munkám második felében célul tűztük ki az exoszómák által mediált tumor-gazda kommunikáció alaposabb megismerését. Céljaink a következők voltak:

- Sztenderd protokoll beállítása a B16F1 egér melanoma sejtek által termelt exoszómák izolálására, majd azok karakterizálása.
- Az exoszómák különböző immunsejtekre: a dendritikus sejtekre, T limfocitákra és makrofágokra gyakorolt hatásának vizsgálata

Alkalmazott módszerek

- A vanillinek és citosztatikumok A375 melanoma sejtek osztódására gyakorolt hatásának vizsgálata XTT sejt proliferációs esszével

- Az NF- κ B jelátviteli út vonal vizsgálata NF- κ B-Luc.4 riporter rendszerrel stabilan transzfektált sejteken luciferáz esszé alkalmazásával

- A vanillinek tumorelleses hatásának vizsgálata *in vivo* NSG egér xenograft modell segítségével
- Exoszómák karakterizálása atomi erő- és transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével
- Exoszómák dendritikus sejtekre és T sejt proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata [³H]-timidin inkorporációs tesztel
- Makrofágok citokin és kemokin profiljának vizsgálata multi-dot blot Proteome Profiler Array segítségével

Eredmények összefoglalása

Munkám első részében az A375/NF-κB-Luc.4 (neo) melanoma riporter sejtek aldehyd és/vagy doxorubicin kezelés hatására adott NF-κB választ és a hatóanyagok proliferációra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A tíz aldehyd közül hat, a 2,4,6-trimetoxi-benzaldehyd, a 2,5-dimetoxi-benzaldehyd, a 2-nitro-benzaldehyd, a TBA, az *ortho*-vanillin és 3-quinolin-karboxaldehyd citosztatikus hatással rendelkeztek. Közülük a leghatásosabban a 2,4,6-trihidroxibenzaldehyd és az *ortho*-vanillin gátolta az A375 human melanoma sejtek proliferációját. A doxorubicin koncentrációfüggően aktiválta az NF-κB jelátviteli utat. A doxorubicin kezelés hatására megemelkedett NF-κB választ a 2,4,6-trimetoxi-benzaldehyd, 2,4-dihidroxibenzaldehyd, 2-nitro-benzaldehyd, 2,4,6-trihidroxibenzaldehyd, *ortho*-vanillin és 3-quinolin-karboxaldehyd molekulák hatékonyan csökkentették; közülük a legaktívabbnak szintén az *ortho*-vanillin bizonyult. Az *ortho*-vanillin nem csak a doxorubicinre adott NF-κB választ csökkentette, hanem a melanoma sejtek alap (konstitutív) aktivitását is.

Az *ortho*-vanillin és 2,4,6-trihidroxibenzaldehyd NF-κB gátló hatását egy másik családba tartozó kemoterápiás szer, az alkiláló ciklofoszfamid esetében is megvizsgáltuk. A 4-hidroperoxi-ciklofoszfamid, amely a ciklofoszfamid *in vitro* alkalmazható aktív formája, 12,5 μM-os koncentrációban 50%-kal növelte a sejtek NF-κB aktivitását, amelyet az *ortho*-vanillin 43%-kal, míg a 2,4,6-trihidroxibenzaldehyd 20%-kal csökkentett.

Az *in vitro* kísérletek alapján legígéretesebbnek talált *ortho*-vanillint és 2,4,6-trihidroxibenzaldehydet választottuk *in vivo* xenograft kísérleteinkhez. Klinikai modellt felállítva A375 humán melanomával oltottunk NSG immundeficiens egereket, majd megvizsgáltuk az aldehyd monoterápia és a ciklofoszfamid + aldehyd adjuváns terápia primér tumorra gyakorolt hatását. Az ciklofoszfamid és *ortho*-vanillin adjuváns terápia már a tumor

beadásától számított 15. napon szignifikánsan csökkentette a primér tumor növekedését, amely szignifikancia a kísérlet végéig megmaradt. Az *ortho*-vanillin monoterápia a 20 napon eredményezett szignifikáns primér tumor csökkenést. A 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid ciklofoszfamiddal kombinált terápiaként volt hatékony a tumor beadását követő 20 napon, míg monoterápiaként a 15 és 20. napon gátolta jelentős mértékben a primér tumor növekedését. A ciklofoszfamid kezelés csak a 20 napra fejtette ki szignifikáns tumor növekedés gátló hatását.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy mind az *ortho*-vanillin, mind a 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid tumor ellenes hatással rendelkezik *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt.

Munkám második részében az exoszómák immunoduláló hatásának vizsgálata során az elterjedten használt B16F1 egér melanoma sejtvonalat használtuk. Első lépésként beállítottunk egy sztenderd protokollt az exoszómák *in vitro* termeltetésére és izolálására, amelyet többszöri differenciál szűrést követően ultracentrifugálással valósítottunk meg. Az exoszóma preparátumok azonosítását és validálását atomi erő mikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével végeztük. Az irodalmi adatoknak megfelelő eredményt kaptunk, az általunk tisztított exoszómák 20-100 nm-es mérettartományba esnek, és nem mutatnak belső strukturáltságok, amely kizárja a vírusrészecskékkel való esetleges szennyezettséget. Ezt követően kimutattuk, hogy a melanoma sejtekből származó exoszómák elősegítik a dendritikus sejtek funkcionális érését, melyet a dendritikus sejtek hatására indukált T sejt proliferáció mutatott. Az általunk kapott eredmények ellentmondanak több korábban megjelent tanulmánynak, amelyekben arról számolnak be, hogy az exoszómák megakadályozzák a dendritikus sejtek érését, így képtelenek fokozni a tumor ellenes immunitást. Vannak olyan tanulmányok is, amelyek arról számolnak be, hogy az exoszómák fokozzák a tumor ellenes immunitást. A tumor sejtek által termelt exoszómák tumorantigéneket hordozva aktiválják a dendritikus sejteket, amelyek antigén specifikus citotoxikus T sejt mediálta tumor ellenes hatást váltanak ki. Multhoff és munkatársai bizonyították, hogy a Hsp70/Bag-4 membrán pozitív hasnyálmirigy és vastagbél daganat sejtekből származó exoszómák fokozzák az NK sejtek migrációját és citotoxicitását. Kísérleteink során az exoszóma kezelés hatására aktiválódott az NF- κ B jelátviteli út vonal. A makrofágokban aktivált NF- κ B jelátviteli út vonal összefüggésbe hozható olyan gének expressziójával (VEGF, IL-6, TNF- α), amelye szerepet játszanak a tumorigenezisben, rávilágítva a makrofágok tumorigenezisben betöltött szerepére. Mindezen adatok azt

sugallják, hogy az exoszóma által indukált NF- κ B jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a rosszindulatú folyamatok kialakulásában.

Az exoszóma kezelés hatására megváltozott citokin- és kemokin profil a makrofágok alternatív aktivációját sugallja. Az exoszóma indukció a M1 és M2 citokin- és kemokin profiltól egyaránt eltérő, alternatív mintázatot mutatott. A TIMP1 mátrix metalloproteináz inhibitor szintjének csökkenése összefüggésbe hozható a metasztázis képzéssel. A csökkent tumorelles M1-es immunválaszt tükrözheti az INF γ és IL-16 szintjének csökkenése és az IL-1RA és az IL13 szintjének emelkedése, amelyek jól ismert gátlói az 1-es típusú immunválasznak. A TIMP1 hatása kétoldali lehet a tumoros folyamatokban. A mátrix metalloproteinázok gátlásán keresztül megakadályozhatja a tumorok invázióját és metasztázis képzését, míg mátrix metalloproteináz-független aktivitása révén hozzájárulhat a tumoros folyamatok elősegítéséhez. Ilyen például a mitogén- és az anti-apoptotikus hatás. A CCL2, IL-8 és MIP-1, amelyek a kísérleteink során magas szinten expresszázódtak, összefüggésbe hozhatók a gyulladásos folyamatokkal, az angiogenezissel, tumorigenezissel és a sebgyógyulási folyamatokkal. A MIP-2 és IL8 (CXCL8) kemokinek megnövekedett szintjét a melanoma sejtekben konstitutívan aktív NF- κ B jelátviteli útvonal hatásának tulajdonítják. Mivel azonban olyan kifejezetten anti-tumorális hatású citokin, mint a TNF- α , is jelen volt a kísérleti rendszerben, egyértelmű tumortámogató profil felállítása nem lehetséges.

Exoszómákra irányuló vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a B16F1 sejtek által termelt exoszómák hatással vannak az immunrendszer sejtjeire. *In vitro* körülmények között az exoszómák megváltoztatják a dendritikus sejtek és makrofágok funkcióját; T sejt proliferációt és NF- κ B aktivációt idéznek elő. A melanoma sejtek által termelt exoszómák hatására a makrofágok citokin és kemokin profilja is megváltozik. Az exoszóma kezelés hatására tumort támogató, és tumoros folyamatokat gátló citokinek és kemokinek is kimutathatóak voltak.

A megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a tumor sejtek által kibocsátott exoszómák immunológiai szempontból aktív résztvevői a daganatos folyamatoknak. A daganatok környezetében, sok tényező miatt, eleve a kettes típusú polarizáltság jellemző. Bár esetünkben, *in vitro* környezetben, kettős arcot mutat a citokin és kemokin profil, az exoszómák a daganatos környezetben nagy valószínűséggel ezt a kettes típusú, vagyis tumor támogató környezetet erősítik. Kijelenthetjük tehát, hogy az exoszómák daganatos mikrokörnyezet többi elemével szorosan kölcsönhatva, aktív szereplőként vesznek részt a tumorok fejlődésének különböző szakaszaiban.

Következtetések

A vizsgált aldehidek közül a természetben is előforduló *ortho*-vanillin és a 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid hatásosan gátolták az A375 humán melanomasejtek proliferációját. Az aldehidek egyaránt csökkentették a melanoma sejtek alap- és a citosztatikum kezelés hatására megemelkedett NF- κ B válaszát. Az *in vivo* kísérletek során az A375 humán melanoma sejtekkel oltott NSG egerek primér tumor növekedését is szignifikánsan gátolta a 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid és az *ortho*-vanillin, ciklofoszfamiddal kombimációs terápia és monoterápiaként egyaránt. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy a vizsgált aldehidek vagy további analógjaik citosztatikum-kezelés adjuvánsaként alkalmazhatóak.

A melanóma sejtekből származó exoszómák segítik a dendritikus sejtek érését, ezáltal megnövekedett T sejt proliferációt váltanak ki. Képesek aktiválni a makrofágokat, ami NF- κ B aktivációval jár. Az exoszómával kezelt makrofágok citokin/kemokin mintázata határozott immunológiai aktivitást mutat és egyaránt eltér a lipopoliszachariddal és interleukin-4-gyel kezelt sejtek mintázatától. Az melanoma sejtek által termelt exoszómák komplex és egyedi immunmoduláló hatásuk alapján diagnosztikai vagy terápiás célpontként javasolhatóak.

Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10032800

Tézis alapjául szolgáló közlemények

Marton A, Kúsz E, Kolozsi C, Tubak V, Zagotto G, Buzás K, Quintieri L, Vizler C. Vanillin Analogues o-Vanillin and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Inhibit NFκB Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma. *Anticancer Res, in press* IF=1,826

Marton A, Vizler C, Kusz E, Temesfoi V, Szathmary Z, Nagy K, Szegletes Z, Varo G, Siklos L, Katona RL, Tubak V, Howard OM, Duda E, Minarovits J, Nagy K, Buzas K. Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell functions in vitro. *Immunol Lett.* 2012 Nov-Dec;148(1):34-8. IF: 2,337

További közlemények

Pérez-García LA, Csonka K, Flores-Carreón A, Estrada E, Mellado-Mojica E, Németh T, López-Ramírez LA, Toth R, López MG, Vizler C, **Marton A**, Toth A, Nosanchuk JD, Gacser A, Mora Montes HM. Role of Protein Glycosylation in Candida parapsilosis Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Frontiers in Microbiology* 2016 Mar 8;7:306. IF=4,165

Hackler L Jr, Ózsvári B, Gyuris M, Sipos P, Fábián G, Molnár E, **Marton A**, Faragó N, Mihály J, Nagy LI, Szénási T, Diron A, Párducz Á, Kanizsai I, Puskás LG. The Curcumin Analog C-150, Influencing NF-κB, UPR and Akt/Notch Pathways Has Potent Anticancer Activity In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2016 Mar 4;11(3):e0149832. IF=3.057

Schäfer B, Orbán E, Fiser G, **Marton A**, Vizler C, Tömböly C. Semisynthesis of membrane-anchored cholesteryl lipoproteins on live cell surface by azide-alkyne click reaction, *Tetrahedron Letters* 2016; 57: 868-873. IF=2,379

Buzas K[#], **Marton A**[#], Vizler C, Gyukity-Sebestyen E, Harmati M, Nagy K, Zvara A, Katona R, Tubak V, Endresz V, Nemeth I, Olah J, Vigh L, Biro T, Kemeny L. Bacterial sepsis increases survival in metastatic melanoma: Chlamydia pneumoniae induces macrophage polarization and tumor regression. *J. Invest. Dermatol.* 2016 Apr;136(4):862-5.

[#] megosztott első szerző. IF=7.216

Manczinger M, Bocsik A, Kocsis GF, Vörös A, Hegedűs Z, Ördögh L, Kondorosi É, **Marton A**, Vizler C, Tubak V, Deli M, Kemény L, Nagy I, Lakatos L The absence of N-acetyl-D-glucosamine causes attenuation of virulence of *Candida albicans* upon interaction with vaginal epithelial cells in vitro. *Biomed Res Int* 2015;2015:398045. IF=2,134

Virágh M, **Marton A**, Vizler C, Tóth L, Vágvölgyi Cs, Marx F, Galgóczy L Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein and Cell* 2015;6:(7) pp. 518-528. IF=3,817

Zádor F, Lénárt N, Csibrány B, Sántha M, Molnár M, Tuka B, Klivényi P, Vécsei L, **Marton A**, Vizler C, Oláh M, Borsodi A, Benyhe S, Páldy E. Low dosage of rimonabant leads to anxiolytic-like behavior via inhibiting expression levels and G-protein activity of kappa opioid receptors in a cannabinoid receptor independent manner. *Neuropharmacology*, 2014 Oct 16;89C:298-307. IF=5,106

Jósvay K, Winter Z, Katona RL, Pecze L, **Marton A**, Buhala A, Szakonyi G, Oláh Z, Vizler C. Besides neuro-imaging, the Thy1-YFP mouse could serve for visualizing experimental tumours, inflammation and wound-healing. *Scientific Reports*, 2014 Oct 27;4:6776. IF=5,578

Marton A, Kolozsi C, Kusz E, Olah Z, Letoha T, Vizler C, Pecze L. Propylene-Glycol Aggravates LPS-Induced Sepsis through Production of TNF- α and IL-6. *Iran J Immunol*. 2014 ;11(2):113-22.

Nagy LI, Molnár E, Kanizsai I, Madácsi R, Ózsvári B, Fehér LZ, Fábián G, **Marton A**, Vizler C, Ayaydin F, Kitajka K, Hackler L Jr, Mátés L, Deák F, Kiss I, Puskás LG. Lipid Droplet Binding Thalidomide Analogs Activate Endoplasmic Reticulum Stress and Suppress Hepatocellular Carcinoma in a Chemically Induced Transgenic Mouse Model. *Lipids Health Dis*. 2013 Nov 22;12(1):175. IF=2,31