

In situ sejtciklus analízis és connexin expresszió
tanulmányozása melanocytás daganatok
progressziója során

Doktori tézisek

Dr. Kiszner Gergő

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Krenács Tibor, DSc., kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Csonka Tamás, PhD., egyetemi tanársegéd
Dr. Nardainé Dr. Imrédi Eleonóra, PhD., egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tóth Erika, Ph.D., főorvos
Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

1. Bevezetés

Melanocytás daganatok

Világszerte évente közel háromszázezer főnél diagnosztizálnak malignus melanomát. A betegség előfordulása Ausztráliában a legmagasabb, de Észak-Amerikában és Európában is jelentős. A bőrben lévő melanocyták rosszindulatú daganatának patogenezisében az ibolyántúli sugárzás játszik kulcsszerepet.

A melanomák kétharmada *de novo* alakul ki, kisebb hányaduk viszont egy megelőző festéksejtes anyajegy (közönséges vagy dysplasticus naevus) malignus transzformációjával. A dysplasticus naevusok és a korai, vékony melanomák egymástól való elkülönítése a valós patológiai gyakorlatban is kihívást jelenthet, a klinikai és szövettani hasonlóságuk, valamint az egyértelmű biomarkerek hiánya miatt. A „driver” genetikai elváltozások közül a BRAF, NRAS és TERT, valamint funkcióvesztő CDKN2A mutációk már a benignus festéksejtes naevusokban is előfordulhatnak. A malignus daganatok sajátosága azonban a kontrollálatlanul fokozott sejtproliferáció, melynek irányába a növekedési jelutak és a sejtciklus-szabályozás hibái konvergálnak. A melanomák fokozott replikációját naevusokhoz viszonyítva kimutatták számos sejtciklusfehérje immunhisztokémiai vizsgálatával, azonban a különböző sejtciklusfrakciók összehasonlító vizsgálatát melanocytás daganatokban még nem végezték el előttünk, sem összevetésüket a daganatprogresszióval. Saját munkánkban kimutattuk, hogy a poszt-G1 fázisszabályozók vékony melanomákban megjelentek, míg dysplasticus naevusokban hiányoztak, ezzel jelezték a malignitást. Az elkülönítőképeség szenzitivitása tovább nőtt azzal, hogy az S fázis promotor cyclin A kimutatását a replikáció-engedélyező MCM6-éval és az általános proliferációs marker Ki67-ével kombináltuk.

A sejtciklus szabályozása

A sejtciklus két fő fázisa a DNS megkettőződésével járó S fázis, valamint a kromoszómák szétválását jelző mitózis (M fázis). A köztes ún. G1, ill. G2 „gap” előkészítő fázisokban az előbbieket végrehajtásához szükséges fehérjék szintézise zajlik.

A G1 fázis során a fő szabályozók a cyclin D-CDK4/6 komplexek. A cyclin D szintézisét növekedési faktorok által indukált szignáltranszdukciós folyamatok eredményezik. Ugyanezek a folyamatok felelősek a CDK4/6-gátló INK4-család tagjainak (pl. p16^{INK4a}) lebontásáért is. Az aktív cyclin D-CDK4/6 komplex foszforilálja az RB-t, mely mindaddig gátló komplexet képezett

az E2F és DP transzkripciós faktorok dimerével. A sejtciklusban ez az esemény a restriktív pont, ahonnan már nincs szükség a növekedési faktorok jelenlétére. Az RB gátlása alól felszabadult E2F-DP komplex olyan gének transzkripcióját indítja el, mint a cyclin E és A, vagy a DNS-replikáció során szereplő fehérjék. A sejtciklus további fázisaiban is a cyclinek által aktivált CDK kinázok biztosítják a folyamat előrehaladását: a G1 és S fázis közti átmenetben a cyclin E a CDK2-vel képez komplexet, majd az S fázisban a cyclin E helyét a cyclin A veszi át, ugyancsak a CDK2-vel komplexet képezve. Ezek legfőbb gátló szabályozói a CIP/KIP CDK-inhibitorok (pl. p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1}). A G2 és M fázis átmeneti szakaszában a cyclin A a CDK1-gyel képez komplexet, míg az M fázisban a cyclin B-CDK1 komplex dominál.

Az aurora kinázok elsősorban az M fázist szabályozzák. Az aurora A az S fázistól a centroszómákhoz kötődik, segíti azok érését és az M fázisban a mitotikus orsó működését. Az aurora B a kromoszómákban és a mitotikus orsóban foglal helyet, szerepe pedig a kromoszómák kondenzációjában és szétválásában, valamint a citokinézis során van.

A replikáció folyamatában nélkülözhetetlen szerepet játszik az MCM2-7 replikációt engedélyező komplexnek, mely már a G1 fázis elején hozzákötődik a magi DNS-ek replikációs origóihoz, így megjelölve a majdani DNS-szintézis kiindulási helyeit. A hexamer az S fázis során a DNS szuperspirál széttekerésében is szerepet játszik. A replikáció alatt az MCM-alegységek leválnak a DNS-ről. A geminin az S, G2 és korai M fázisban mutat expressziót, szerepe az örökítőanyag ismételt replikációjának megakadályozása az M fázis befejezése előtt, a felszabadult MCM komplexet távol tartva a DNS-től.

A topoizomeráz enzimek a kromatin szerkezeti változásait úgy idézik elő, hogy transesterifikációs reakcióval reverzibilisen hasítják a DNS-láncokat, miközben a szabad végeket megkötik. Erre szükség van a transzkripció, „repair” mechanizmusok, replikáció, rekombináció és a kromoszómák kondenzációja során is, amikor a kitekeredett DNS-szakasz körül megnőtt a torziós feszültséget oldani kell. Az I-es típusú topoizomerázok működésük során csak az egyik DNS-szálat hasítják, míg a II-es típusúak mindkettőt.

A Ki67 fehérje kimutatását már az 1990-es évek eleje óta alkalmazzák a patológiában, osztódó sejtek azonosítására. A protein szerepet játszik többek között a kromatin strukturális változásaiban mind a replikáció, mind a mitózis során. A Ki67 expressziója a G1 fázisban kezdődik meg, többek között E2F hatására, majd a mitózisig folyamatosan növekszik, annak végén viszont a fehérje szintje gyorsan lecsökken.

Connexinek és direkt sejt-kommunikációs csatornák

A multicelluláris szervezet összehangolt működéséhez elengedhetetlen a sejtek szoros együttműködése. A réskapcsolatok („gap junction”, GJ) a szomszédos sejtek között direkt kommunikációs csatornákat biztosítanak, melyek kis hidrophil molekulák transzportját teszik lehetővé. Gerincesekben a réskapcsolatok connexin fehérje hexamerekből épülnek fel, melyeknek emberben 21 izotípusát figyelték meg. Az oligomerizáció a transz-Golgi hálózatban vagy az endoplazmás retikulumokban zajlik, és csak meghatározott connexin-izotípusok között történhet. A sejtmembránra kijutó réskapcsolatok százezer plakkokba tömörülnek, majd hidrogénkötésekkel biztosítják a szomszédos sejtek közötti csatornák kialakulását.

A connexinek nemcsak a szomszédos sejteket összekapcsoló réskapcsolatokat, hanem az extracelluláris térbe nyíló ún. félcsatornákat („hemichannel”) is létrehozhatnak, ezeken át pl. parakrin szignálokat közvetíthetnek. Továbbá a csatornafunkciótól eltérő folyamatokban is részt vesznek, pl. gátolhatják a proliferációt, szabályozhatják a sejthalált és migrációt. A connexinokkal (elsősorban azok intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális régiójával) kapcsolatban álló félszáz fehérjére, mint „gap junction proteome”-ra vagy „connexin interactome”-ra hivatkoznak. Citoszkeletális, sejtadhéziós és intracelluláris transzport fehérjék, proto-onkogének és tumorszuppresszorok tartoznak közéjük.

A connexinek daganatokban betöltött szerepe az eddigi megfigyelések alapján szintén sokrétű. Először tumorszuppresszor tulajdonságaikra figyeltek fel, például a sejt-növekedés gátlása vagy az apoptózis serkentése révén. A kémiai tumorpromoterek és proliferatív szignálok (RAS, RAF, Src) gátolták a réskapcsolatokat, míg a tumorszuppresszor gének serkentették azokat. Connexin-deficiens transzgenikus egereket fokozott daganatképződés jellemzett. A connexinek proliferációgátló hatásukat részben a sejtciklusra fejtik ki: például a Cx43 indukciója osteosarcoma sejtekben a CDK-gátló p27^{KIP1} magasabb szintjével vagy hepatocellularis carcinomában a cyclin D1 csökkenésével járt együtt. Ugyanakkor a daganatokat támogató szerepük is lehet, pl. az EMT elősegítésével vagy a tumorsejtek és endothelsejtek közötti réskapcsolatok révén az erekben való áthaladás támogatásával. Áttéti daganatokban réskapcsolatot mutattak ki emlőráksejtek és osteoblastok között, vagy gyomorráksejtek és mesothelialis sejtek között, aminek a csont- illetve peritonealis metasztatizálás során lehet szerepe. Agyi áttétek esetén az astrocytákkal kialakított réskapcsolat segítette a daganatok túlélését, és kemorezisztenciát eredményezett. Kimutatták réskapcsolatok szerepét a gliomák agyi inváziójában, valamint, hogy a Cx43 a citoszkeletonnal együttműködve segítette a sejt-motilitást. Tumorsejtek és az immunrendszer sejtjei közötti „gap junction” kapcsolatoknak

az antigénprezentációban, gyulladásoz reakció kiváltásában, és daganatellenes hatások közvetítésében lehet szerepe.

A connexin csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak az epidermális funkciók koordinálásában, amit a bőrben expresszázó számos izotípus (Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx37, Cx45, Cx30, Cx26, Cx43) és a mutációkkal járó öröklődő bőrszindrómák is kihangsúlyoznak. Ezidáig a Cx43 és a Cx26 szerepét igazolták az epidermális keratinocyták és környező melanocyták közötti direkt metabolikus kapcsolat biztosításában. Noha vannak kísérleti adatok a connexinek szerepére a melanoma kialakulásának és metasztázis inváziójának szabályozásában, a melanocytás tumorprogresszióra vonatkozó vizsgálatok klinikai esetekben hiányosak. A legtöbb közlemény a Cx43-at ismerteti, mely vagy hiányzik, vagy szignifikánsan csökken melanomában, s így hozzájárul a daganatnövekedés és pusztulás feletti kontroll elvesztéséhez és az áttétképzéshez. Funkcionális vizsgálatok egy „gap junction”-hiányos egér melanoma modellben kimutatták, hogy a Cx43 forszírozott expressziója helyreállította a közvetlen sejtközötti kapcsolatot, illetve csökkentette a daganatsejt-proliferációt és a kitapadás-független növekedést. A növekedésgátlást *in vivo* is megerősítették csirke chorioallantois membránba ültetett daganatokkal. Hasonlóan, a Cx43 overexpressziója egy humán melanoma sejtvonalban elősegítette a TNF α -mediált apoptózist, valamint xenograft modellben redukálta a tüdőáttétek számát és méretét is. További connexin-izotípusokat is azonosítottak melanomában, azonban tisztázatlan funkciókkal.

Munkánkban a connexin-expressziót mind mRNS mind fehérjeszinten vizsgáltuk, primer melanocytákban, melanoma sejtvonalakban és klinikai naevus- és melanomamintákban. Ugyancsak végeztünk *in silico* vizsgálatokat a connexingének átírását kvantitatívan elemezve melanoma progressziós csoportokban, valamint funkcionálisan vizsgáltuk a direkt sejtközötti kommunikációt primer melanocytákban és melanoma sejtvonalakban.

A közös naevusok és melanomák közötti legkiemelkedőbb különbség a Cx43-expresszió elvesztése volt. A diffúz citoplazmatikus Cx26, paranukleáris Cx32 és Cx30.2 emelkedése a melanoma-progresszió során, és az indukált Cx43, Cx26 és Cx30 fehérjék a melanoma körüli epidermisben, valamint a Cx43 emelkedése a daganatot övező vaszkuláris endotheliumban a kétirányú adaptív interakciókat tükrözik daganat és mikrokörnyezete között.

2. Célkitűzések

A sejtproliferáció mértéke gyakran arányos a tumorok agresszivitásával, azonban az általános sejtciklus markerek pl. Ki67 kimutatása nem ad információt a daganatproliferáció dinamikájáról. A connexinek és az általuk alkotott réskapcsolatok szerepét a sejtek közötti homeosztázis szabályozásában, illetve daganatokban tumorszupresszorként vetették fel, azonban melanomákban eddig csak sporadikus információk voltak hozzáférhetőek. Ezért a közönséges naevus – dysplasticus naevus – vékony melanoma – vastag melanoma – melanoma metasztázis tumorprogresszió során tanulmányoztuk:

1. a sejtciklusfrakciók megoszlását a G1, S-G2, ill. G2-M fázisokra jellemző fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával,
2. külön figyelmet fordítva a dysplasticus naevusok és vékony melanomák közötti elkülönítésre használható markerek, ill. markerkombinációk kutatására, mivel ez gyakran komoly differenciáldiagnosztikai kihívás;
3. a GEO adatbázisban a melanocytás neopláziák connexin-génexpressziójára vonatkozó releváns vizsgálatok *in silico* adatait;
4. melanoma sejtvonalakban és melanocytá tenyészetekben a connexin izotípusok expresszióját *in vitro* mRNS és fehérje szinten, valamint a réskapcsolat-csatornafunkciókat;
5. a releváns connexin izotípusok *in situ* expresszióját immunhisztokémiai módszerrel, saját klinikai-diagnosztikus tumorszövetekben.

3. Módszerek

Connexin izotípusok expressziójának in silico analízise melanocytákban és melanocytás neoplasiákban

A nyilvánosan elérhető Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) tanulmányoztuk a humán melanocytás daganatok biopsziás mintáiban mért és közölt, a connexin izotípusok génexpressziójára vonatkozó adatokat. Olyan vizsgálatokat válogattunk be, melyek többféle melanocytás elváltozást tartalmaztak (naevusok vs. melanomák, primer vs. áttéti melanomák), így lehetőséget biztosítottak azok összehasonlítására, valamint melyek a több connexin-gént is tartalmazó Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (GSE7553: 2 *in situ*, 14 primer, 40 áttéti melanoma) illetve U133A (GSE3189: 18 naevus, 45 melanoma; GSE8401: egér xenograft modell; 31 primer, 52 áttéti melanoma) gén-chipeket használtak. A génexpressziós adatokat normalizációt követően a GCRMA gén-chip algoritmussal, az átlagos expressziós értékek figyelembevételével, párosítatlan t-próbával vizsgáltuk. A „fold-change”-et $p < 0,001$ esetén tekintettük szignifikáns különbségnek.

Melanoma sejtvonalak és melanocyta kultúrák

A humán invazív melanoma sejtvonalakat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének tumorbankjából gyűjtöttük. Az A2058 agyi metasztázisból származik, a HT199 tüdőbe és májba áttétet adó melanomából, a WM983/A pedig egy vertikális növekedési fázisú daganatból. Az epidermális melanocytákat a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján izolálták, plasztikai műtéten átesett egészséges személyek bőréből.

RNS-izolálás, cDNS-átírás, valós idejű PCR

A sejttényészetekből az RNS-t RNeasy Mini Kit-tel izoláltuk, a reverz transzkripcióhoz High Capacity cDNA Revers Transcription Kit-et használtunk. A reverz transzkripció polimeráz-lánreakció (qRT-PCR) során TaqMan próba alapú detektálást alkalmaztunk, hogy kvantifikálhassuk a connexin izotípusok expresszióját az ACTB (β -actin) háztartási („housekeeping”) génjéhez viszonyítva.

Festéktranszfer-analízis

A sejteket kettős fluoreszcens jelöléssel láttuk el, a membránfoszfolipidet permanensen jelölő, vörös színű DiI festékkel és a membránon átjutó calcein-acetoximetilészterrel, melyet az intracelluláris észterázok hidrofil, zöld színű calceinné alakítanak, ez utóbbi a sejtek közötti réskapcsolatokon képes közlekedni. 10^5 kettős jelölt sejtet 9×10^5 jelöletlen sejtrel elegyítettünk, és 5 órán át sejtenyésztő flaskában inkubáltunk, hogy konfluensen letapadhassanak, és kialakulhassanak a sejtközötti kapcsolatok. Ezt követően mintánként 20000 szuszpendált sejtet számoltunk meg áramlási citométerrel. A DiI-pozitív sejtfrakció az eredetileg kettős jelölt sejteket reprezentálták, míg a csupán calcein-festődött sejtek a réskapcsolati kommunikációval arányban jöttek létre.

Melanocytás bőrelváltozások szövetszövetmintái, szövetszöveti multiblokk

19 közönséges (CN) és 63 dysplasticus naevus (DN), valamint 63 primer (PM; 23 „vékony” ≤ 1 mm és 40 „vastag” > 1 mm) és 22 áttéti melanoma (MMet, nyirokcsomó vagy bőr) archivált blokkját gyűjtöttük össze a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján diagnosztizált anyagok közül. A fenti anyagokból 2 mm átmérőjű szövethengereket vágunk ki, majd 70 mintás szövetszöveti multiblokkba (TMA) gyűjtöttük őket, a számítógép-vezérelt TMA Master (3DHistech, Budapest) készülék segítségével. A connexin-expressziós vizsgálatok során az egyik TMA-blokk már kevés mintát tartalmazott, így azt kihagytuk az értékelésekből. Az elemzésre alkalmas esetszámok az alábbiakra csökkentek: 16 CN, 58 DN, 49 PM (22 vékony, köztük 6 *in situ*, valamint 27 vastag) és 19 MMet.

Immunhisztokémia és immuncitokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a TMA-blokkok metszeteit deparaffináltuk, majd az antigénfeltáráshoz elektromos kuktában vagy mikrohullámú sütőben, pufferoldatban hőkezeltük. A sejtciklus vizsgálatához monoklonális egér- vagy nyúlantitesteket használtunk (aurora A és B, CDK2, cycin A és D1, geminin, Ki67, MCM6, p16^{INK4A}, topoizomeráz II α /Top2a), a connexinek detektálásához poliklonális nyúlantitesteket (Cx43/GJA1, Cx46/GJA3, Cx32/GJB1, Cx26/GJB2, Cx30/GJB6, Cx30.2/GJC3). Az antigénkötődést Novolink polimer-peroxidáz kittel detektáltuk. Az enzimaktivitást a melanintól jól elkülöníthető, piros színű AEC kromogénnel tettük láthatóvá, mikroszkópos kontroll mellett. Magfestéshez hematoxilint használtunk.

Az immunfluoreszcens vizsgálatához a nyúl eredetű anti-connexin primer antitesteket egér eredetű anti-vimentin, anti-Ki67 vagy Melan A antitestekkel elegyítettük, hogy a sejtstruktúrát, proliferációt illetve a melanocyta eredetet láthatóvá tegyük. A primer antitesteket Alexa Fluor 488 illetve 546 konjugált kecske anti-egér (488) illetve anti-nyúl (546) IgG H+L szekunder antitestekkel kezeltük, majd a sejtmagot Hoechst festéssel jelöltük.

A szövettani metszeteket Panoramic Scan (3DHistech) mikroszkóppal digitalizáltuk, és a géphez tartozó szoftverrel, dermatopatológus segítségével megszámoltuk a reprezentatív területeken a pozitív tumorsejtek arányát. Ezek kategorizálására olyan skálákat határoztunk meg, melyek jól elkülönülő csoportokat hoztak létre:

	0	1	2	3
cyclin D1, CDK2, MCM6, Ki67, p16 ^{INK4a}	< 1%	1–9%	10–29%	≥ 30%
cyclin A, geminin, Top2a, aurora A és B	< 1%	1–4%	5–19%	≥ 20%
Cx46, Cx26	< 10%	10–49%	50–74%	≥ 75%
Cx43, Cx32, Cx30.2	< 5%	5–24%	≥ 25%	

A vaszkuláris connexin-pozitivitás megállapításához kétfokozatú skálát használtunk: 0: ≤5% (negatív) és 1: >5% (pozitív), az epidermális keratinocyták értékelésére pedig Haass és mtsai felosztását: 0: negatív; 1: stratum granulosum; 2: legfelső rétegek („uppermost layers”); 3: szuprabazális rétegek („suprabasal layers”); 4: minden réteg („all layers”).

Az immunhisztokémiai reakciók statisztikai értékeléséhez dichotomizálást követően kétoldalas Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztunk, a teoretikus szomszédos progressziós fokozatokat összehasonlítva, nevezetesen: naevus/melanoma illetve CN/DN, DN/vékony PM, vékony/vastag PM, vastag PM/MMet. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük. Az expressziós profilok és tumorprogressziós csoportok lehetséges korrelációját súlyozatlan hierarchikus klaszteranalízissel is elemeztük.

A sejtciklusfehérjék mint a biomarkerek szenzitivitását illetve specificitását is értékeltük, illetve diszkriminancia-analízist is végeztünk a biomarker-kombinációk prediktív értékének megállapításához, „leave-one-out” módszerrel keresztvalidálva.

4. Eredmények

Sejtciklusfázisok progressziója melanocytás daganatokban

A közönséges naevusok alacsony szinten általános (MCM6: 8/17, Ki67: 4/19) és G1 fázismarkereket (cyclin D1: 8/19, CDK2: 1/19) expresszáltak, az utóbbiak dysplasticus naevusokban szignifikánsan megemelkedtek (cyclin D1: 46/58 $p=0,004$; CDK2: 48/60 $p<0,001$). A poszt-G1 fázismarkerek, mint az S–G2 (cyclin A: 17/23, geminin: 13/23, Top2a: 10/21) és G2–M (aurora A: 2/20 és B: 8/21) fázisok szabályozói, a vékony melanomákban váltak kimutathatóvá, így szignifikánsan felülregulálódtak a naevusokhoz viszonyítva ($p<0,001$ – $p=0,025$). Az MCM6 (20/20) és Ki67 (17/21) expressziója ugyancsak szignifikáns emelkedést mutatott vékony melanomákban, a dysplasticus naevusokhoz viszonyítva. Vastag melanomákban a sejtciklus-progressziós markerek szignifikánsan felülregulálódtak a vékonyakhoz képest ($p<0,001$ – $p=0,026$), kivéve az MCM6-ot, cyclin D1-et és CDK2-t, ami a korai sejtciklusmarkerek állandó szintjére és a poszt-G1 fázisok akcelerációjára utal. A vizsgált fehérjék expressziója nem mutatott szignifikáns különbséget vastag és áttéti melanomák között. A részletes *in situ* fehérje-expressziós profil alapján a dysplasticus naevusoktól a vastag melanomákig terjedő tumorprogresszió párhuzamba állítható a sejtciklusmarkerek fokozatos akcelerációjával.

Diszkriminanciaanalízist végeztünk a markerkombinációk prediktív értékének meghatározásához, a dysplasticus naevusok és vékony melanomák elkülönítésére. Az MCM6 ($\geq 10\%$ határértéknél) + Ki67 ($\geq 1\%$) vagy cyclin A ($\geq 1\%$) bizonyult a legjobb markerkombinációnak, mely helyesen osztályozta az eredeti minták 95,9%-át és a keresztvalidált esetek 93,2%-át, 89,5%-os szenzitivitással és 92,6%-os specificitással.

In silico connexin génexpresszió analízis

A GSE3189 array adathalmazában a melanomák többek között csökkent GJA1 (Cx43) és fokozott GJB1 (Cx32) génexpressziót mutattak, naevusokkal összehasonlítva. A GSE7553 array-ben primer melanomákhoz képest az áttéti melanomák csökkent GJA1 (Cx43) és GJB2 (Cx26) génexpressziót mutattak. A GSE8401 array-ben xenograft modellekből származó melanoma metasztázisokban ugyancsak csökkent GJA1 (Cx43) génexpresszió mutatkozott, primer melanomákkal összehasonlítva. A fenti különbségek szignifikánsak voltak ($p<0,001$).

Connexin génexpresszió tenyésztett primer melanocytákban és melanoma sejtvonalakban

A Cx izotípusok expressziójának küszöbciklusát („cycle threshold”, cT) a háztartási gén ACTB-vel hasonlítottuk össze (ΔcT). A GJA1 (Cx43) gén csupán a melanocyta tenyésztetben expresszáldott ($\Delta cT=3,34$), azonban melanoma sejtvonalakban nem. A GJB1 (Cx32) melanocytában nem volt azonosítható, de markánsan expresszáldott mindhárom melanoma sejtvonalban (ΔcT 4,92–6,65). A GJB2 (Cx26) melanocytában ($\Delta cT=4,53$) és WM983/A-ban ($\Delta cT=3,78$) szignifikánsan magasabb szinten expresszáldott, mint a másik két melanoma sejtvonalban (ΔcT 8,51–12,45; $p<0,001$). A GJC3 (Cx30.2) alacsony szinten valamennyi mintában expresszáldott (melanocyta: $\Delta cT=12,38$ és melanomák: ΔcT 11,29–12,93).

Connexin fehérje-izotípusok in situ detektálása melanocytás daganatokban

Szövetmetszetekben, a Cx43 (GJA1) mint granuláris sejtplazma- és sejtmembrán-reakció volt megfigyelhető az epidermális keratinocytákban, valamint közöttük és a melanocyták között. Minden közönséges és a dysplasticus naevusok nagy része (23/35) pozitív volt. Ha a gyenge reakciót (sejtek $\leq 25\%$ -a) negatívnak tekintettük, a pozitivitási ráta szignifikánsan magasabb volt 11/13 közönséges naevusban mint 12/35 dysplasticusban ($p=0,003$). Alig figyeltünk meg Cx43 reakciót közönséges (1/10) és dysplasticus naevusok (0/46) felszínes régióiban, valamint primer (1/45) és áttéti melanomákban (2/18).

Közepes intenzitású Cx32 (GJB1) jelet láttunk 62/70 naevusban és 65/67 melanomában. Membranózus Cx32 lokalizációt figyeltünk meg 6/16 közönséges, míg csak 6/54 dysplasticus naevusban ($p=0,023$) és 7/67 melanomában. Paranukleáris Cx32 festődést találtunk 8/27 vastag és 2/18 áttéti melanomában, míg vékony (0/22) melanomákban ($p=0,006$) vagy naevusokban (0/70) ($p=0,001$) nem találtunk ilyen reakciót.

A Cx26 (GJB2) fehérjét különböző szubcelluláris lokalizációkban figyeltük meg: naevusokban javarészt paranukleárisan (41/65), szemben a melanomák diffúz sejtplazmái reakciójával (44/67, $p=0,002$). Továbbá, a Cx26-ot expresszáldó sejtek aránya szignifikánsan kevésbé volt magas naevusokban (40/65), mint melanomákban (57/67, $p=0,003$).

Szövetekben a Cx30.2 (GJC3) alig volt azonosítható közönséges (0/13) vagy dysplasticus naevusban (2/45). Gyakoribb volt primer melanomákban (2/18 vékony, 8/25 vastag) és áttétes esetekben (4/17), ahol citoplazmatikus és gyakran paranukleáris reakcióként jelentkezett. Naevus és melanoma között a különbség szignifikáns volt ($p=0,002$).

Sejtciklusszabályozó és connexin fehérjék expressziójának összehasonlítása

Dysplasticus naevusokban az intradermalis területeken Cx43-at expresszáló eseteknél szignifikánsan gyakoribb volt a p16^{INK4a}-pozitivitás is ($p=0,012$), míg csökkent a CDK2 expresszió ($p=0,027$). Megfigyelésünk szerint a membranózus Cx32-t kifejező közöséges és dysplasticus naevusok egyúttal mind Cx43-pozitívak is voltak, és a CDK2-vel leírt szignifikáns negatív összefüggés a Cx32-vel is kimutatható volt ($p=0,027$). Magas p16^{INK4a} expresszió ugyancsak szignifikánsan gyakoribb volt Cx32-pozitív mint -negatív naevusokban ($p=0,043$). Vastag primer és áttéti melanomákat összevonva a Cx30.2 expresszióval szignifikánsan fokozódott a Top2a ($p=0,041$), aurora A ($p=0,041$) és aurora B ($p=0,014$) kinázok expressziója is.

A „gap junction” kommunikáció festéktranszfer analízise

10^5 DiI + calcein-AM kettős pozitív sejtet 9×10^5 jelöletlen sejtrel ko-kultúrába tettünk, majd inkubálás után áramlási citometriával elemeztük a sejtek közötti festéktranszferet. A szimplán (csupán calceinnel) jelölődött sejtek aránya a connexin-mebráncsatornákon lezajlott direkt festéktranszfer mértékét jelezte. Míg a primer melanocyták 75,11%-a, addig az A2058 sejtek csupán 6,39%-a, a HT199 3,85%-a és a WM983/A sejtek 0,86%-a mutatott egyedüli calcein pozitívítást.

Connexin expresszió a tumor mikrokönyezetben

A vaszkuláris és limfatikus endothelialis sejtek gyakrabban voltak Cx43 pozitívak melanomákban (38/59), mint naevusokban (7/50, $p<0,001$). A primer melanomákkal határos epidermisben a Cx43 immunreakció intenzív volt, és valamennyi sejtréteget érintette, ellentétben az egészséges epidermisszel, ahol ez csak a bazális és szuprabazális rétegekre volt jellemző. A daganat körüli felhám szignifikánsan magasabb Cx26 expressziót mutatott melanomákban (27/45), mint naevusokban (8/63, $p<0,001$), és a különbség szignifikáns volt a vékony (6/22) és vastag (21/23) melanomák között is ($p<0,001$). A Cx30 ugyancsak szignifikánsan gyakrabban expresszálódott az epidermális keratinocytákban a primer melanomák fölött (20/34), mint naevusok esetében (11/63, $p<0,001$), és több vastag (15/17) mint vékony melanoma (5/17, $p=0,001$) volt érintett.

5. Következtetések, új megfigyelések

A sejtciklusfrakciók (G1, S-G2, G2-M) *in situ*, szisztémás összehasonlító vizsgálatát melanocytás daganatok progressziója során elsőként végeztük el, mely során megállapítottuk, hogy:

1. A dysplasticus naevusokban szignifikánsan több a korai sejtciklusmarkerrel (cyclin D1, CDK2) pozitív tumorsejt, mint a közönséges naevusokban. Az S-G2 fázismarkerek hiánya a replikációmegrekedésére utal G1 fázisban.
2. A poszt-G1 fázismarkerek (cyclin A, geminin, topoizomeráz II alfa, aurora kináz B) először vékony melanomákban jelennek meg, így a malignitás indikátorai lehetnek.
3. Az MCM6 relatív magas gyakorisága (sejtek >10%-a) már alacsony (>1%) Ki67 pozitivitás mellett megnöveli a melanoma valószínűségét, ezt tovább erősítheti akár csupán alacsony (>1%) cyclin A vagy más poszt-G1 fázis-marker. Így a vékony melanomák, ill. dysplasticus naevusok 95,9%-a, 89,5%-os szenzitivitással és 92,6%-os specificitással elkülöníthető.
4. A poszt-G1 fázismarkerek progresszív expressziót mutatnak a dysplasticus naevus (negatív)–vékony melanoma–vastag melanoma sorozat mentén, többségük a vastag, vertikális növekedésű melanomákban tetőzött.

Bár egyes connexin izotípusok eltűnését, ill. megjelenését melanomában már leírták, melanocytás daganatok progressziója során ezt szisztémásan mi vizsgáltuk először. Megállapítottuk, hogy:

1. A primer melanocyták GJA1/Cx43, GJA3/Cx46 és alacsony szinten GJB2/Cx26 és GJC3/Cx30.2 mRNS-t expresszálnak, ám közülük csupán a Cx43 fehérje lokalizálódik a sejtmembránon, kommunikációs csatornákat képezve. Elsőként azonosítottuk a GJC3/Cx30.2 izotípust melanocytákban és melanomákban, ill. a GJB1/Cx32 izotípust melanomákban.
2. A melanocytás daganatfejlődést heterogén connexin izotípus-expresszió, így a Cx43 elvesztése, a diffúz citoplazmatikus Cx26 termelés emelkedése, ill. a Cx30.2 és Cx32 növekvő gyakoriságú paranukleáris reakciója jellemzi.
3. A Cx43 és Cx32 expresszióját naevusokban a sejtciklusgátlásra utaló fokozottabb p16^{INK4a} és alacsonyabb CDK2 immunreakció kíséri, míg melanomákban a Cx30.2 izotípus

jelenlétével poszt-G1 fázis fehérjék mutatnak pozitív összefüggést, ami intenzívebb proliferációt sugall.

4. A connexinek melanómában ritkán képeznek direkt kommunikációs csatornákat, amire membránreakcióik hiánya és a sejtvonalakban megfigyelt alacsony mértékű festéktranszfer utal.

5. A melanómák epidermális mikrokörnyezetében a Cx43, Cx26 és Cx30, a környező nyirok- és vérerekben pedig a Cx43 expresszió felülregulálódik. Így klinikai szövetmintákban a neoplasztikus sejtek és mikrokörnyezetük connexin-mintázata alapján három fő klaszter különíthető el: a) vastag melanómák, b) közöséges és dysplasticus naevusok, ill. 3) dysplasticus naevusok és vékony melanómák.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kiszner G**, Balla P, Wichmann B, Barna G, Baghy K, Nemeth IB, Varga E, Furi I, Toth B, Krenacs T. (2019) Exploring differential connexin expression across melanocytic tumor progression involving the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 11: 165. (**IF = 6,126**)
2. **Kiszner G**, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, Krenacs T. (2014) Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. *Virchows Arch*, 464: 603-612. (**IF = 2,651**)

A disszertációtól független közlemények

1. Tökés T, Tökés AM, Szentmártoni G, **Kiszner G**, Mühl D, Molnár B, Kulka J, Krenács T, Dank M. (2020) Prognostic and clinicopathological correlations of cell cycle marker expressions before and after the primary systemic therapy of breast cancer. *Pathol Oncol Res*, 26: 1499-1510. (**IF = 3,201**)
2. Tökés T, Tökés AM, Szentmártoni G, **Kiszner G**, Madaras L, Kulka J, Krenács T, Dank M. (2016) Expression of cell cycle markers is predictive of the response to primary systemic therapy of locally advanced breast cancer. *Virchows Arch*, 468: 675-686. (**IF = 2,848**)
3. Rajnai H, Teleki I, **Kiszner G**, Meggyesházi N, Balla P, Vancsik T, Muzes G, Csomor J, Matolcsy A, Krenacs T. (2015) Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas. *J Immunol Res*, 2015: 528098. (**IF = 2,812**)
4. Szentkúti G, Dános K, Brauswetter D, **Kiszner G**, Krenács T, Csákó L, Répássy G, Tamás L. (2015) Correlations between prognosis and regional biomarker profiles in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*, 21: 643-650. (**IF = 1,940**)
5. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, **Kiszner G**, Balla P, Samu A, Krenacs T. (2014) Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PLoS One*, 9: e112541. (**IF = 3,234**)

6. Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, Balla P, **Kiszner G**, Teleki I, Kovago C, Krenacs T. (2015) Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. *Cell Stress Chaperones*, 20: 37-46. **(IF = 2,583)**
7. Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, Balla P, **Kiszner G**, Teleki I, Jeney A, Krenacs T. (2014) DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia. *Strahlenther Onkol*, 190: 815-822. **(IF = 2,914)**
8. Stelkovics E, **Kiszner G**, Meggyeshazi N, Korom I, Varga E, Nemeth I, Molnar J, Marczinovits I, Krenacs T. (2013) Selective in situ protein expression profiles correlate with distinct phenotypes of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Histol Histopathol*, 28: 941-954. **(IF = 2,236)**
9. 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: 653-667. **(IF = 2,613)**