Synovialis sarcoma vizsgálata *in vitro* miR-206 módosított modellrendszerben és likvid biopsziás mintákban

Doktori tézisek

Dr. Mihály Dóra

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola

Témavezető:
Dr. Sápi Zoltán, D.Sc. egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:
Dr. Skaliczki Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Schaff Zsuzsa, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Szász A. Marcell, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Szőke János, Ph.D., központvezető főorvos

Budapest
2020

1. BEVEZETÉS

A synovialis sarcoma (SS) a harmadik leggyakoribb malignus lágyrészdaganat, mely a bizonytalan szöveti differenciációt mutató lágyrésztumorok csoportjába tartozik. Testszerte bárhol, bármilyen életkorban kialakulhat, azonban többnyire fiatal felnőtteket érintő rossz prognózisú betegség. Szövettanilag monofázisos és bifázisos altípusait különböztetjük meg. A SS a csökkent SMARCB1 fehérje expressziót mutató daganatok csoportjába tartozik.

A *SMARCB1* gén a SWI/SNF ATP-függő kromatin-átrendező komplex központi alegységét kódolja, fehérjéje a genom stabilitását ellenőrzi, a sejtciklust szabályozza és tumorszuppresszor feladatokat lát el. A *SMARCB1* génfunkció elvesztése malignus rhabdoid tumorokban (MRT) vált ismertté, melynek hátterében a gén biallélikus károsodása áll. Epithelioid sarcomában (ES) a *SMARCB1* kiesésért nem a gén biallélikus mutációja tehető felelőssé. Esetükben a fehérjevesztést gyakran a *SMARCB1* mRNS-ének miRNS-ek általi csendesítése okozza, melyet munkacsoportunk korábbi tanulmányai igazolták. Bifázisos SS esetén az orsósejtes komponensben csökkent, míg az epithelialis komponensben megtartott a SMARCB1 fehérje expresszió. Ennek hátterében a betegség patognomikus fúziós géntermékе, az SS18-SSX kimérikus fehérje, illetve epigenetikai szabályozás, például a miR-206, miR-381, miR-671-5p mikroRNS-ek (miRNS) overexpressziója állhat, melyeket munkacsoportunk írt le először SS esetén. A miR-206 bizonyos daganatokban overexpressziója révén onkomiRNS-ként, másokban downexpressziója révén szuppresszor miRNS-ként funkcionál. SS-ban a legerősebb *SMARCB1* csendesítő miRNS-nek a miR-206 bizonyult, így figyelmünk a továbbiakban a miR-206 irányába terelődött.

Több szolid daganat esetén detektálhatók a vérben a primer tumorból származó szabadon keringő tumorsejtek és sejtmentes tumor eredetű szabad nukleinsavak. Míg tüdőrák, vagy vastagbélrák esetén a likvid biopszia jól alkalmazható módszere a mérhető reziduális betegség (MRB) kimutatásának, addig SS esetén eddig ellentmondásos eredmények születtek ezzel kapcsolatban.

2. CÉLKITŰZÉS

Kísérleteink során a munkacsoportunk által korábban már tanulmányozott *SMARCB1* tumorszuppresszor gén és fehérje expressziójának eltűnését kívántuk mélyrehatóbban vizsgálni *in vitro* sejttenyészeti modellekben. Egy újonnan létrehozott sejtvonal, az SS-iASC segítségével szerettünk volna utánajárni, hogy a synovialis sarcomára jellemző fúziós gén, mint ezidáig elfogadott tumorgenezist iniciáló genetikai eltérés és az általunk kimutatott emelkedett szintű miR-206, mint epigenetikai eltérés, hogyan befolyásolja a *SMARCB1* expresszióját *in vitro* modellekben.

Emellett elemezni szerettük volna az *SS18-SSX* kimérikus gén jelenlétét SS-val diagnosztizált és kezelésen átesett betegek perifériás vérmintáiban.

Főbb céljaink, feltételezéseink a következők voltak:

1. Az SS-iASC sejtvonalban bizonyítani kívántuk az *SS18-SSX1* fúziós gén mRNS és fehérje szintű expresszióját, illetve vizsgálni szerettük volna, hogy a sejtvonalban kimutathatók-e a synovialis sarcomára jellegzetes immunfenotípusbeli eltérések.

2. Előző *in vitro* tranziens kísérleteinkben használt miR-206 miRNS permanens transzfekcióját terveztük a korábbi nem tumoros és tumoros sejtvonalak mellett (HDFα, HT-1080 és Caco2) további két genetikailag módosított sejtvonalban (iASC és SS-iASC), melyekben a *SMARCB1* és a miR-206 további hat célgénjének (*ACTL6A*, *CCND1*, *POLA1*, *MET*, *NOTCH3*, *G6PD*), valamint az epithelialis mezenchimális tranzíciós (EMT) marker *SNAI1*-nek az

mRNS szintű expresszióját terveztük meghatározni.

3. A miR-206 transzfekciót követően célunk volt az SS18-SSX1 fúziós fehérjét kifejező SS-iASC-206 sejtekben a SMARCB1 fehérje expressziójának vizsgálata.

4. Vizsgálni kívántuk, hogy a synovialis sarcomára patognomikus fúziós géntermék (*SS18-SSX*) kimutatható-e synovialis sarcomás betegek perifériás vérében 6 hónappal a terápiát követően, és ha igen, akkor alkalmas diagnosztikus eszköze lehet-e a betegség követésének.

3. MÓDSZEREK

3.1. Sejtkultúrák és miRNS permanens transzfekció

Két genetikailag módosított (SS-iASC és iASC), két humán tumoros (HT-1080 és Caco2) és egy normál, nem tumoros (HDFα) sejtvonalat tenyésztettünk. A transzfekciós kísérletekhez szükséges miR-206-ot OriGene humán miRNA MIR206 molekula formájában (OriGene Technologies) szereztük be. A sejtvonalakat elektroporációval transzfektáltuk a Neon™ transzfekciós rendszer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) segítségével. A transzfekciót követően a plazmidokban lévő antibiotikum szelekciós marker segítségével stabil sejtvonalakat hoztunk létre.

3.2. Az SS-iASC sejtvonal vizsgálata

Az újonnan létrehozott sejtvonalat kariotipizálásnak vetettük alá. A sejtvonalban lévő *SS18-SSX1* fúziós transzkriptum mRNS és fehérje szintű expresszióját valós-idejű kvantitatív PCR-rel (q-RT-PCR), nested PCR-rel, valamint immunfluoreszcens immuncitokémiai festéssel és Western blot vizsgálattal tanulmányoztuk. Emellett immuncitokémiai festésekkel megvizsgáltuk a sejtvonal immunfenotípusát.

3.3. A miR-206 célgének relatív expressziójának meghatározása

A transzfektált sejtvonalakban q-RT-PCR-rel vizsgáltuk a miR-206 overexpresszió hatására bekövetkező célgének (*SMARCB1*, *ACTL6A*, *CCND1*, *POLA1*, *MET*, *NOTCH3*, *G6PD*) és az EMT marker *SNAI1* expressziójának változásait.

3.4. A SMARCB1 fehérje expresszió meghatározása

A SMARCB1 fehérje expressziójának meghatározásához Western blot, immuncitokémiai és áramlás citometriás vizsgálatokat végeztünk a transzfektáns SS-iASC-206 és nem transzfektáns SS-iASC sejtekben.

3.5. Az *SS18-SSX* fúziós géntermék detektálása likvid biopsziás mintákból

15 synovialis sarcomás beteg perifériás véréből nukleinsav izolálást követően nested PCR és droplet digitális PCR (ddPCR) módszereivel kívántuk detektálni a fúziós transzkriptumot 6 hónappal a diagnózist követően esetleges MRB után kutatva.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az SS-iASC sejtvonal bemutatása

Az SS-iASC sejtek megőrizték a kiindulási iASC sejtvonal szerkezeti és számbeli kromoszóma eltéréseit.

Az SS-iASC sejtek stabilan kifejezték mind mRNS, mind fehérje szinten az *SS18-SSX1* fúziós transzkriptumot. Az SS-iASC sejtekben fokális citoplazmatikus cytokeratin pozitivitást és erősebb citoplazmatikus β-catenin reakciót láttunk, szemben az iASC sejtekkel, melyekben negatív cytokeratin festődés és enyhe citoplazmatikus β-catenin reakció volt megfigyelhető.

4.2. A miR-206 célgénekre gyakorolt hatásának vizsgálata miR-206 transzfekciót követően sejttenyészetekben

Ahhoz, hogy tanulmányozhassuk a miR-206 *SMARCB1*-re és további célgénekre gyakorolt hatását permanensen transzfektáltuk az SS-iASC, iASC, HT-1080, Caco2 és HDFα sejtvonalakat. A transzfekció után az öt sejtvonalból csak négyet tudtunk tanulmányozni, ugyanis a HDFα-206 sejtek az antibiotikum szelekciót követően növekedésükben és osztódásukban megálltak, majd elpusztultak.

A *SMARCB1* expresszió az SS-iASC-206-ban 64%-ra, az iASC-206-ban 83%-ra csökkent szignifikánsan ($p<0,05$). Az SS-iASC-206-ban mért nagyobb csökkenés hátterében a kimérikus SS18-SSX1 fehérje és a miR-206 együttes hatása állhatott.

Csak a *MET* és *CCND1* onkogének mutattak egyöntetű downregulációt mRNS szinten a miR-206 hatására, mely annak köszönhető, hogy a miR-206 ezen sejtvonalak esetén feltételezhetően szuppresszor miRNS-ként funkcionált.

A miR-206 az SS-iASC-206, iASC-206 és Caco2-206 sejtekben túlnyomóan a target gének downregulációját eredményezte, míg a HT-1080-206-ban több célgént felülszabályozott.

4.3. A miR-206 hatása a SMARCB1 fehérje expressziójára

Western blot vizsgálattal egyik sejtvonalon sem tudtunk kimutatni SMARCB1 fehérje expresszió csökkenést. A SMARCB1 immuncitokémiai vizsgálatok során azonban az SS-iASC-206 sejtek egy szubpopulációjában mérsékelt SMARCB1 expresszió csökkenés látszott, szemben az SS-iASC sejtekkel. Ezt a finom csökkenést áramlás citometriával is kimutattuk.

4.4. Az *SS18-SSX* fúziós transzkriptum, mint lehetséges biomarker synovialis sarcomás betegek likvid biopsziás mintáiban

4.4.1. A betegek klinikai adatainak áttekintése

Vizsgálatainkba 15 synoviális sarcomával diagnosztizált beteget vontunk be. A betegek között 4 férfi és 11 nő szerepelt. A diagnóziskor az átlagéletkor 45 év volt (tartomány: 24-72 év). Kilenc esetben (60%) a tumor perifériásan, míg 6 esetben (40%) centrálisan helyezkedett el. A diagnózis pillanatában 10 páciens (66,7%) betegsége volt

áttétes, disszeminált, míg 5 beteg esetében (33,3%) nem volt kimutatható metastasis. Szövettanilag 11 daganat (73,3%) monofázisos altípusúnak, míg 4 tumor (26,6%) bifázisos hisztológiájúnak mutatkozott. Összesen 1 beteget (7,7%) kezeltek kizárólag sebészi úton, a további 14 páciens (93,3%) esetében a sebészi terápiát adjuváns kemo-és radioterápiával egészítették ki. A primer daganat 6 betegnél (40%) recidivált.

4.4.2. A nested PCR és ddPCR eredményei a SS betegek vérmintáiban

Nested PCR-rel egyik betegnél sem tudtuk detektálni az *SS18-SSX1/2* fúziós transzkriptumot az agaróz-gélelektroforézist követően, azonban ddPCR-rel egy betegnél kis mennyiségben kimutattuk az *SS18-SSX2*-es fúziós génterméket. Ennek a betegnek primer pulmonális synovialis sarcomája volt, kombinált kezelésen esett át, majd ezek ellenére az ellenoldali tüdőben áttét alakult ki. A fennmaradó tizennégy esetben nem tudtuk kimutatni a kimérikus transzkriptumot.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat főbb megállapításai a következők:

- Elsőként hoztuk létre és alkalmaztuk *in vitro* sejttenyészeti modellként az *SS18-SSX1*-et kifejező immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejtvonalat, az SS-iASC-t, mely alkalmas *in vitro* modellrendszere a synovialis sarcomának.

- Az SS-iASC sejtvonal mind mRNS, mind fehérje szinten stabilan kifejezi az *SS18-SSX1* fúziós gént.

- Az SS-iASC sejtvonalban a fúziós gén sikeresen indukált mezenchimális epithelialis tranzíciót.

- A permanens miR-206 transzfekció után 4 sejtvonalban (iASC-206, SS-iASC-206, Caco2-206 és HT-1080-206) mért különböző génexpressziós értékek arra utalnak, hogy a miR-206 adott célgénre gyakorolt hatása sejtvonal-függő, vagyis a miR-206 egy erősen szövet-és sejtspecifikus miRNS.

- A SMARCB1 esetén látott mRNS és fehérjeszintű eredmények arra utalnak, hogy a miR-206 onkomiRNS szerepe fontos, de nem kizárólagos a *SMARCB1* gén csendesítésében synovialis sarcoma esetén.

- Synovialis sarcomás betegeinkkel végzett vizsgálataink alapján megállapítjuk, hogy a kezelés alatt álló betegekben a tumor eredetű nukleinsav fragmentumok

kimutathatósága ritka eseménynek számít, így a fúziós gén likvid biopsziás mintákban való kimutatása kevésbé alkalmas módszer a kiújulás követésére, vagy egy esetleges metastasis kialakulásának detektálására.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Mihaly D**, Nagy N, Papp G, Papai Z, Sapi Z. (2018) Release of circulating tumor cells and cell-free nucleic acids is an infrequent event in synovial sarcoma: liquid biopsy analysis of 15 patients diagnosed with synovial sarcoma. Diagn Pathol, 13: 81.

IF: 2,528

2. **Mihaly D**, Papp G, Mervai Z, Reszegi A, Tatrai P, Szaloki G, Sapi J, Sapi Z. (2018) The oncomir face of microRNA-206: A permanent miR-206 transfection study. Exp Biol Med (Maywood), 243: 1014-1023.

IF: 3, 005

3. **Mihaly D**, Matula Z, Changchien YC, Papp G, Tatrai P, Sapi Z. (2017) First cloned human immortalized adipose derived mesenchymal stem-cell line with chimeric SS18-SSX1 gene (SS-iASC). Cancer Genet, 216-217: 52-60.

IF: 2,396

6.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Papp G, **Mihaly D**, Sapi Z. (2017) Unusual signal patterns of break-apart FISH probes usen in the diagnosis of soft tissue sarcomas. Path Oncol Res, 23: 863-871.

IF: 1,935