

Streszczenie

Czerniak skóry jest stosunkowo rzadką chorobą, jednak odpowiada za zdecydowaną większość zgonów spowodowanych nowotworami skóry. Niepokojący jest fakt, że ogólnoświatowe wskaźniki zapadalności rosną systematycznie od kilku dekad. Pomimo znacznego postępu w zakresie możliwości terapeutycznych czerniak jest chorobą obarczoną wysoką śmiertelnością, a jej przebieg bywa trudny do przewidzenia. Kliniczno-patologiczne analizy dotyczące czynników i mechanizmów warunkujących rozwój i progresję nowotworów w istotny sposób przyczyniają się do doskonalenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego z chorymi. Badania leżące u podstaw niniejszej rozprawy dotyczyły kilku białek, t.j. SMAD7, RhoA, ROCK1 oraz ROCK2, związanych z onkogenezą poprzez wpływ na takie procesy jak wzrost, adhezja, zdolności migracyjne, polarność czy inwazyjność komórek oraz powstawanie przerzutów. Rola tych wybranych białek była wcześniej analizowana w oparciu o komórki i tkanki innych nowotworów, a także hodowle komórkowe czerniaka, jednak charakterystyka kliniczno-patologiczna ich ekspresji w tkankach pochodzących od chorych na czerniaka nie była dotąd zbadana. Wobec tego, podstawą eksperymentów opisanych niniejszą rozprawą była duża kohorta pacjentów z pierwotnym czerniakiem skóry oraz tkanki poszczególnych guzów usuniętych na drodze zabiegów operacyjnych. Z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych dokonano oceny ekspresji białek SMAD7, RhoA, ROCK1 oraz ROCK2 w komórkach nowotworowych, a w przypadku białek ROCK także w limfocytarnych naciekach towarzyszących guzom (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs). Uzyskane dane dotyczące ekspresji były następnie analizowane statystycznie w poszukiwaniu powiązań z profilem klinicznym pacjentów (np. wiek, płeć) oraz detaliczną charakterystyką histopatologiczną (np. typ histologiczny czerniaka, głębokość nacieku, indeks mitotyczny czy stopień nacieku przez TILs). Ważnym elementem eksperymentów było przeprowadzenie analiz przeżycia pacjentów grupowanych na podstawie ekspresji poszczególnych białek, co umożliwiło ocenę ich przydatności jako biomarkerów prognostycznych.

Pierwsza część badań opisanych w rozprawie dotyczyła znaczenia ekspresji białka SMAD7 będącego inhibitorem szlaku sygnałowego receptorów dla transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), cytokiny o właściwościach m.in. silnie hamujących rozwój nowotworów w ich wczesnych stadiach. Półilościowa ocena obecności SMAD7 w komórkach ponad dwustu przypadków czerniaka skóry oraz konfrontacja uzyskanych danych z innymi parametrami mikroskopowymi oraz charakterystyką kliniczną pacjentów dowiodły, że zwiększona ekspresja

SMAD7 wiąże się z agresywnością choroby. Guzy o wysokiej immunoreaktywności SMAD7 cechują się bardziej złośliwym fenotypem mikroskopowym (np. wyższym indeksem proliferacyjnym, większą głębokością nacieku czy obecnością owrzodzenia) oraz agresywnością kliniczną – rokowanie u chorych z czerniakami o wysokiej ekspresji SMAD7 jest znamienne gorsze w porównaniu do chorych z guzami o niskiej ekspresji tego białka. Co warto podkreślić, analiza wielowariantowa pokazała, że ekspresja SMAD7 jest niezależnym, silnym markerem prognozy u pacjentów z czerniakiem skóry (hazard względny (HR) dla przeżycia wolnego od nawrotu = 2,88; HR dla przeżycia całkowitego = 3,16). Jego ocena może okazać się pomocna przy planowaniu schematu kontroli po leczeniu chirurgicznym, jak też dalszego postępowania terapeutycznego. Uzyskane wyniki uprawdopodobniają hipotezę, że jednym z mechanizmów umożliwiających progresję czerniaka od wczesnych do zaawansowanych stadiów jest przełamanie antynowotworowego działania TGF- β poprzez nadekspresję białka SMAD7 w komórkach guza.

W kolejnym eksperymencie przeprowadzonym w ramach przewodu doktorskiego zbadano profil ekspresji białka RhoA w czerniaku. Jest to molekularny przełącznik o aktywności GTPazy, który steruje kluczowymi z punktu widzenia onkogenezy procesami, jak m.in. apoptoza, inwazyjność czy tworzenie przerzutów. Chociaż dane literaturowe wiązały hiperaktywność RhoA z większym zaawansowaniem i agresywnością różnych nowotworów nabłonkowych, znaczenie kliniczne ekspresji RhoA w czerniaku skóry pozostawało niewiadomą. W wyniku badań po raz pierwszy wykazano korelację ekspresji RhoA w nowotworowych melanocytach z prawdopodobieństwem wznowy choroby i zgonu związanego z nowotworem. Co szczególnie istotne, zaobserwowana zależność jest odwrotna niż w przypadku większości nowotworów, a mianowicie w bardziej zaawansowanych czerniakach wewnątrzkomórkowa ilość białka RhoA spada, a jego niska ekspresja jest niezależnym markerem niekorzystnej prognozy. Dane te dowodzą, iż aktywność i rola RhoA w różnych nowotworach nie stanowią paradygmatu.

Ostatnia część rozprawy dotyczyła ekspresji w czerniaku skóry białek ROCK1 oraz ROCK2 stanowiących kinazy efektorowe dla RhoA, których biologiczna aktywność jest bezpośrednio regulowana przez tę GTPazę. Do najlepiej poznanych ról tych enzymów należy regulacja stabilności cytoszkieletu aktynowego oraz kurczliwości komórek. Poprzez modulację tych procesów, a także inne aktywności, białka ROCK wpływają m.in. na przyczepność, migrację i inwazyjność komórek. W przedstawionej tu pionierskiej analizie wykazano, że obniżona ekspresja ROCK1 oraz ROCK2 wiąże się z wyższym stopniem klinicznego

zaawansowania choroby oraz mikroskopowymi wykładnikami jej agresywności, m.in. większą grubością wg Breslowa, wyższym indeksem mitotycznym czy guzkowym typem histologicznym. W analizie Kaplana-Meiera jedynie ekspresja ROCK2 w komórkach czerniaka była cechą różnicującą pacjentów względem długości przeżycia, jednak prognostyczny charakter tego parametru nie został potwierdzony w analizie wieloczynnikowej. Ponieważ postuluje się udział białek ROCK w regulacji odpowiedzi immunologicznej, w eksperymencie przeanalizowano, poza komórkami guza, ekspresję ROCK1 i ROCK2 w TILs. Jednak tylko w przypadku ROCK2 zaobserwowano istotną statystycznie, dodatnią zależność pomiędzy immunoreaktywnością limfocytów, a stopniem naciekania przez nie mikrośrodowiska czerniaka. Ponadto, podobnie jak w przypadku melanocytów, ekspresja obu białek ROCK w TILs istotnie wiązała się z charakterystyką kliniczno-patologiczną czerniaka. Znaczenie kinaz ROCK w komórkach podścieliska nowotworowego, w tym komórkach układu odpornościowego, jest w zasadzie niezbadanym aspektem onkogenezy. Przytoczone obserwacje sugerują, że ta tematyka może być warta pogłębionych analiz.

Podsumowując, do najważniejszych wyników i wniosków płynących z przeprowadzonych badań należy zaliczyć:

1. Nadekspresja SMAD7 przez komórki czerniaka może być mechanizmem ucieczki od przeciwnowotworowego działania TGF- β .
2. Progresja czerniaka skóry wiąże się z supresją szlaku RhoA/ROCK.
3. Melanocytarna ekspresja białek SMAD7 oraz RhoA ma niezależną wartość prognostyczną dla pacjentów z czerniakiem skóry.
4. Ekspresja GTPazy RhoA oraz kinaz ROCK nie jest bezpośrednio skorelowana w komórkach czerniaka, co sugeruje to odmienną regulację transkrypcji i/lub obrotu wewnątrzkomórkowego tych białek.
5. Ekspresja kinaz ROCK przez TILs może funkcjonalnie wiązać się z patogenezą czerniaka skóry.
6. Analizy kliniczno-patologiczne oparte się o ekspresję białek w materiale tkankowym pochodzącym od pacjentów mają istotną rolę przy weryfikacji obserwacji pochodzących z badań na eksperymentalnych modelach nowotworów.

Summary

Melanoma of the skin is a relatively rare disease, but accounts for a majority of deaths caused by skin cancers. It is disturbing that global melanoma incidence has been on the rise for several decades. Despite significant progress with regard to therapeutic modalities in melanoma, mortality rates remain high and course of the disease is frequently unpredictable. Clinicopathological analyses touching upon various mechanisms of cancer development and progression substantially contribute to improvement of patient care. Studies that form the foundation of this dissertation were related to several proteins, namely SMAD7, RhoA, ROCK1 and ROCK2, involved in oncogenesis through their influence on growth, adhesion, migration, polarity and invasiveness of tumor cells as well as their metastatic potential. The roles of these proteins have been previously analyzed in cell cultures and tissues of various cancers, however, clinicopathological characteristics of their expression have not yet been determined in clinical samples of cutaneous melanoma. Therefore, experiments described in this dissertation were based on a large cohort of patients with melanoma of the skin and tissues of respective resected tumors. Expression of SMAD7, RhoA, ROCK1 and ROCK2 was determined immunohistochemically in melanoma cells as well as in tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in the case of ROCK proteins. Subsequently, these observations were statistically tested for correlations with clinical background of patients (e.g. age, gender) and histopathological features of melanoma (e.g. histological type, tumor thickness, mitotic rate or TIL grade). The prognostic utility of selected proteins was assessed through survival analyses of patients stratified according to corresponding expression characteristics.

The first study concerned the significance of expression of SMAD7, an inhibitor of transforming growth factor β (TGF- β) signaling. Semiquantitative evaluation of SMAD7 protein in cancer cells of over two hundred primary melanomas and confrontation of acquired results with other microscopic and clinical parameters revealed that SMAD7 expression is associated with disease aggressiveness. Elevated SMAD7 immunoreactivity correlated not only with aggressive microscopic phenotype (higher mitotic index and depth of invasion or presence of ulceration) but also with the clinical course of melanoma (considerably worse prognosis for patients with high SMAD7-expressing tumors). What is noteworthy, multivariable analyses proved that SMAD7 acts as an independent prognostic biomarker in relation to recurrence-free survival and overall survival. In the future, assessment of SMAD7 expression in melanoma might become useful in planning adequate treatment and follow-up regimens. Presented

findings are consistent with a hypothesis that overexpression of SMAD7 by malignant melanocytes is an escape mechanism from TGF- β -related growth control.

Another experiment conducted within the PhD project was an investigation of RhoA expression in primary melanomas. This molecular switch with GTPase activity affects several processes closely associated with oncogenesis, such as apoptosis, invasiveness or metastatic dissemination. Links between hyperactivity of RhoA and higher stages as well as aggressiveness of various epithelial malignancies were reported in the scientific literature, but the clinical significance of RhoA expression in melanoma has remained unknown. Presented study for the first time revealed a correlation between melanocytic RhoA immunoreactivity and probability of disease recurrence or melanoma-associated death. Importantly, this correlation is opposite to observations of most types of cancer, i.e. intracellular levels of RhoA decrease in advanced melanomas and low expression of this protein is an independent marker of unfavorable prognosis. These results argue that activity and role of RhoA are not universal and conserved among various tumors.

The last part of this dissertation is an analysis of ROCK1 and ROCK2 expressed in cutaneous melanomas. These proteins are effector kinases whose biological activities are intimately regulated by RhoA GTPase. The best studied functions of ROCK enzymes include control of cytoskeleton dynamics and cell contractility. By these and other activities ROCK proteins influence cellular adhesions, migration and invasiveness. The present study pioneeringly demonstrated that downregulated expression of ROCK1 and ROCK2 in melanoma cells is associated with higher clinical stage of the disease and microscopic features of its aggressiveness, e.g. greater Breslow thickness, mitotic rate or nodular histotype. According to Kaplan-Meier analysis melanocytic ROCK2 but not ROCK1 expression stratified patients with regard to their survival, but prognostic value of this parameter was not confirmed in a multivariate regression model. Since ROCK proteins seem to be involved in regulation of immune responses, this study included assessment of their expression not only in melanocytes but also in TILs. However, only in the case of ROCK2 there was a statistically significant association between immunoreactivity of lymphocytes and TIL grade. Besides, similarly to tumor cells, expression of either ROCK kinase in TILs was substantially associated with various clinicopathological characteristics of skin melanoma. The role of ROCK1 and ROCK2 expressed by non-neoplastic stromal cells, including immune cells, remain a virtually unexplored aspect of cancer pathogenesis that merits further investigations.

In summary, conducted research led to the following significant results and conclusions:

1. Overexpression of SMAD7 by melanoma cells may be a mechanism by which they evade antitumor activity of TGF- β .
2. Progression of cutaneous melanoma is associated with downregulation of RhoA/ROCK signaling.
3. Melanocytic SMAD7 and RhoA expression have independent prognostic value for skin melanoma patients.
4. Expression of RhoA GTPase and ROCK kinases are not correlated in melanoma cells; this argues for independent regulation of transcription and/or cellular turnover of these proteins.
5. ROCK kinases expressed by TILs may be functionally involved in the pathogenesis of melanoma.
6. Clinico-pathological analyses based on evaluation of protein expression in tissue samples from patients play a role in verifying conclusions derived from studies on experimental models of cancer.