

**A KUTATÁS EREDMÉNYEIT ÖSSZEFOGLALÓ SZAKMAI
ZÁRÓBESZÁMOLÓ**

A pályázat címe

**Gén amplifikációk prognosztikai és biológiai
jelentősége humán melanomákban**

Title of the project

**Prognostic and Biologic Significance of Gene
Amplifications in Human Melanomas**

A pályázat megvalósításában meghatározó szerepet játszott

DE OEC Megeglőző Orvostani Intézet

**Dr. Ádány Róza, Ecsedi Szilvia, Lázár Viktória, Vízkeleti Laura, Dr.
Rákosy Zsuzsa, Papp Orsolya, Lukács Andrea, Kiss Timea,
Koroknai Viktória,**

DE OEC Bőrgyógyászati Klinika

Dr. Bégány Ágnes és Dr. Emri Gabriella

DE OEC Pathológiai Intézet

Dr. Méhes Gábor

2013. október 28.

TARTALOMJEGYZÉK

I.	A pályázat tudományos háttere	3
II.	A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program összefoglalása	4
III.	Alkalmazott módszerek és statisztikai elemzések	5
	III./1. Genomikai és molekuláris biológiai módszerek	5
	III./2. Array CGH eredmények statisztikai elemzése	5
	III./3. Jelátviteli útvonalakhoz rendelhető genetikai eltérések elemzése	5
	III./4. Géneltérések és kliniko-pathológiai adatok összehasonlító elemzése	6
IV.	A pályázati támogatással elért eredmények	6
	IV./1. Primer melanomák gén kópiaszám eltéréseinek analízise array CGH-val	6
	IV./2. A BRAF mutáció jelenlétével összefüggésbe hozható gén alterációk felderítése a MAPK jelátviteli útvonalban	7
	IV./3. Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák FISH analízise kromoszóma entoméra, valamint 7q31 lokusz specifikus DNS próbákkal	9
	IV./3A CAV1 és TES gének mRNS és fehérje expressziós eltérései és kapcsolata a 7q31 kópiaszám alterációkkal	14
	IV./3B A 7-es kromoszóma és a 7q31-es lokusz kópiaszám eltérései, a CAV1 és TES gének expressziója humán melanoma sejtvonalakban	16
	IV./4. Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák FISH analízise kromoszóma centoméra, valamint CCND1 gén specifikus DNS próbákkal, kapcsolata a BRAF és NRAS gének mutációs státuszával	18
	IV./4A A 11-es kromoszóma és a CCND1 gén kópiaszám eltérései	18
	IV./4B A primer melanomák klinikai-patológiai paramétereit és a CCND1 gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat elemzése	20
	IV./4C CCND1 génexpressziós eltérések primer melanomákban és melanoma sejtvonalakban, kapcsolat a kópiaszám alterációkkal és BRAF/NRAS mutációs státusszal	22
V.	A kutatási eredmények összefoglalása, a kutatás további lehetséges irányai, az eredmények felhasználásának, hasznosításának lehetőségei	24
VI.	A zárójelentéshez kapcsolódó közlemények, PhD és TDK dolgozatok (2009-2013)	26
VII.	A pályázati témához szorosan nem kapcsolódó közlemények az OTKA támogatás feltüntetésével	27
Melléklet	29

I. A PÁLYÁZAT TUDOMÁNYOS HÁTTERE

A heterogén fenotípusú melanocita eredetű malignus melanomát a legagresszívabb bőr daganatok között tartják számon. A bőr daganatok okozta halálozások döntő többsége az áttétes melanomáknak tulajdonítható. Kialakulásuk során a transzformált sejtek általában megtartják pigment termelő képességüket barnás léziókat eredményezve a bőrön.

A jelenlegi WHO klasszifikáció a klinikai és szövettani jellemzők alapján 4 altípust különböztet meg: 1.) felszínesen terjedő melanoma (SSM), a leggyakoribb forma, az esetek körülbelül 75%-a ide sorolható, 2.) noduláris melanoma (NM), 3.) lentigo malignus melanoma (LMM), mely leggyakrabban krónikus napsugárzásnak kitett bőrfelületeken jelenik meg, 4.) akrális lentigo melanoma (ALM), mely tipikusan a tenyér és a talp bőrén, köröm alatt vagy a nemi szervek és szájüreg nyálkahártyáján alakul ki. A klasszikus felosztás mellett azonban a molekuláris szintű karakterizálás is egyre nagyobb teret kap, mely alapvetően 2 típust különböztet meg a szőrrel fedett bőrfelületeken kialakuló melanomák esetében: 1.) krónikus napsugárzással nem exponált bőrön megjelenő melanoma, mely gyakori BRAF mutáció mellett, 10q delécióval (10q25: PTEN) vagy NRAS mutációval jellemezhető, 2.) napsugárzás által exponált bőrön kialakuló melanoma és az akrális melanoma nem jellemezhető BRAF vagy NRAS mutációkkal, viszont gyakori a CCND1 gén amplifikáció és az esetek megközelítőleg 20%-ában KIT mutációk jelennek meg. A sima bőrön vagy köröm alatt kialakuló tumorokat genetikai jellemzőik, mint az onkogén amplifikációk és az esetek mintegy 40%-ában kimutatható KIT amplifikáció vagy mutáció alapján akrális melanomáknak tekintik. Ezzel szemben a mukozális melanomák külön csoportot képeznek kromoszóma eltérés mintázataik alapján.

A malignus melanomát nagyfokú genomiális heterogenitás jellemzi. Az eltérő útvonalak érintettsége és az ezek közötti interakciók komplexitása azt sugallja, hogy az egyedi genetikai és molekuláris eltérések önmagukban nem rendelkeznek döntő befolyással a betegség kialakulására és progressziójára. Azonban a különböző alterációk halmozódása, a tumor sejt és mikrokörnyezete közötti „párbeszéd” együttesen már képes eltérő klinikai-biológiai kimenetel kialakítására. Így a molekuláris tulajdonságok figyelembe vétele segíthet a jelenleg létező klasszifikációs rendszerek pontosításában.

A pályázathoz kapcsolódó és korábbi array comparative genom hibridizációs (aCGH) vizsgálataink számos kromoszómális régió, mint a 7q31 vagy 11q13 eltérésének a melanoma agresszív viselkedésében betöltött szerepére világított rá. A 7q31 lokusz magában foglalja a FRA7G törékeny pontot, melynek közvetlen közelében található olyan gének (CAV1 és TES), amik lehetséges célpontjai a tumor genesis során kialakuló genetikai alterációknak. A CAV1, a membrán „lipid tutajainak” fő komponenseként a különböző fehérje interakciók, mint EGFR, H-RAS vagy eNOS révén a sejt életének számos aspektusát befolyásolja. Azonban daganat progresszióban betöltött szerepe vitatott; apoptotikus és anti-apoptotikus hatással egyaránt rendelkezik daganat típus és stádium függvényében. Míg a TES, a fokális adhéziók kulcs molekulájaként befolyásolhatja a tumor sejtek motilitását.

A 11q13-as lokuszon található CCND1 onkogén a sejtciklus G₁/S fázis átmenet fő szabályozó molekulája. Transzkripciós aktiválása elsősorban tirozin kináz receptorok

közvetítésével a Ras–MAPK jelátviteli kaszkádon keresztül valósul meg. Emellett egyéb citokinek, transzkripciós faktorok és extracelluláris mátrix fehérjék PI3K–Akt–mTOR kaszkád stimulációja, valamint a csökkent protein degradáció szintén hozzájárul a megnövekedett CCND1 szinthez.

A fentiek alapján, az új genetikai alterációk és azok szerepének azonosítása a gén expresszió szabályozásában összehangoltan az epigenetikai folyamatokkal, továbbá a malignus transzformációban és daganat progresszióban szerepet játszó molekuláris eltérések jelátviteli utakban betöltött szerepének megismerése új távlatokat nyithat a daganat ellenes terápiában. Az új genetikai eltérések diagnosztikai szerepének tisztázása hozzájárulhat új progresszió specifikus markerek megismeréséhez. A projektben ismertetett kutatásaink ezeknek az eltéréseknek, molekuláris kapcsolatoknak a megismerésére irányultak, megcélozva a 7-es és 11-es kromoszóma génjeit.

II. A KUTATÁS CÉLJA, A MUNKATERVBEN VÁLLALT KUTATÁSI PROGRAM ÖSSZEFOGLALÁSA

- 11q13 amplifikációs klaszterben lokalizálódó gének melanoma prognózisban betöltött szerepének, valamint a kópiaszám eltéréseik és a BRAF-, illetve NRAS-mutációk közötti kapcsolat vizsgálata.
- BRAF vagy NRAS mutációt hordozó, illetve vad BRAF/NRAS genotípusú melanomákra jellemző genetikai eltérések összehasonlítása array CGH analízissel,
- az eltérő genotípusú melanomákban a különböző jelátviteli útvonalakban és útvonalak közötti interakcióban résztvevő gének eltéréseinek vizsgálata,
- 7-es és 11-es kromoszóma genetikai eltéréseinek részletes feltérképezése array comparative genom hibridizációval (CGH), az array eredmények validálása fluoreszcencia in situ hibridizációs (FISH) módszerrel. Szöveti microarray tervezése. Epigenetikai eltérések és genom eltérések összehasonlító analízise.
- Az array CGH eredményeket alapul véve primerek tervezése TaqMan real-time QRT-PCR kísérletekhez (Applied Biosystems), annak érdekében, hogy detektáljuk a vizsgált gének mRNS expresszióját a daganat progresszió különböző fázisaiban. A daganat minták gén expressziós mintázatának összevetése normál epidermisz és naevus mintákéval, míg a melanoma sejtvonalak esetében normál melanocitákéval. A DNS kópiaszám eltérések meghatározása Q-PCR-rel is.
- Fehérje expressziós kísérletek kivitelezése, a molekuláris biológiai jellemzők viszonyítása a betegek klinikai paramétereikhez, adatok összegzése.
- Annak elemzése, hogy a 7-es és 11-es kromoszómákon lokalizálódó, génamplifikációt mutató eltéréseknek van-e prognosztikus és/vagy diagnosztikus jelentősége.
- Eredményeink közzlése nemzetközi és hazai folyóiratokban, valamint eredményeink bemutatása hazai- és nemzetközi konferenciákon.

III. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ÉS STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

III./1. Genomikai és molekuláris biológiai módszerek

Vizsgálatainkhoz a genomika módszerei (array CGH, globális génexpressziós eltérések - Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-, és DNS metiláció kimutatására alkalmas microchipek) mellett a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció módszereket alkalmaztunk. Szöveti microarray „fabrikálása a DE OEC Patológiai intézetével kollaborációban TMA Master (Carl Zeiss, Jena, Germany) alkalmazásával történt. Eredményeink statisztikai elemzésével vizsgáltuk, hogy a különböző stádiumú és típusú szövetekre jellemző genetikai eltérések és a génexpresszió mintázata milyen összefüggésben áll a humán melanomák klinikopathológiai paramétereivel.

III./2. Array CGH eredmények statisztikai elemzése

Az eredmények kiértékelését SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) és R-2.15.0 program csomagok segítségével végeztük. Statisztikai elemzések: Az UCSC genome browser weboldal (<http://genome.ucsc.edu/>) segítségével az array CGH során használt BAC klónokat a humán genomra térképeztük. Az X és Y kromoszómán lokalizálódó oligonucleotid próbákat és az ismert genom variánsokat (Database of Genomic Variants: <http://projects.tcag.ca/variation/>) kizártuk a további elemzésből. A log₂ transzformált adatokat a CGH-Explorer software 3.2 segítségével értékeltük ki. Szignifikáns eltérésnek a többszörös összehasonlítási korrekciót (FDR, false discovery rate) követő P≤0,01 értéket tekintettük. Határértékként egy, az irodalomból ismert és gyakran használt értéket alkalmaztunk a nagymértékű amplifikációt (>0,55 log₂ rate), illetve a homozigóta deléciót (<-0,8 log₂ rate) mutató régiók azonosítására. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel, a variancák egyenlőségét pedig Leven teszttel határoztuk meg. Mivel adataink nem normál eloszlást mutattak, ezért nem parametrikus tesztek alkalmaztunk. Ahol szükséges volt, az adatokat reciprok (CNI) vagy log₂ (mRNS szint) transzformálással normalizáltuk. Receiver operating characteristic (ROC) görbe analízissel határoztuk meg a túlélési analízisnél az optimális CCND1 CNI cutoff értéket. A modell magában foglalta az ismert melanoma prognosztikai faktorokat is, mint az ulceráció és az áttétképzés.

III./3. Jelátviteli útvonalakhoz rendelhető genetikai eltérések elemzése

A jelátviteli útvonalakhoz rendelhető genetikai eltérések elemzése során a különböző útvonalak adatait a Signalink adatbázisból (<http://signalink.org/>) töltöttük le, majd ezeknek a géneknek a kópiaszám eltéréseit a legközelebbi BAC klón (<2MB) segítségével becsültük meg. Egy jelátviteli útvonalban, illetve útvonalak közötti kapcsolatot biztosító jelátviteli interakciót akkor tekintettünk sérültnek, ha legalább az interakcióban résztvevő egyik fehérjét kódoló gén régiójában amplifikációt vagy deléciót azonosítottunk. Ezt követően átlagoltuk a különböző melanoma alcsoportokban a sérültnek definiált jelátviteli interakciók gyakoriságát, az egyes útvonalakban és különböző útvonalak között is.

Random Forest analysis

Munkánk során a microarray vizsgálatok további elemzéséhez a fent említett statisztikai számítások mellett Random Forest algoritmust használtunk, mely az adatbányászatban egy gyakran alkalmazott prediktív modellező technika. Az R statisztikai program Random Forest csomagját használva kiválasztottuk, hogy a BRAF mutációk mellett mely gének eltérései módosíthatják a MAPK jelátviteli útvonal működését (a BRAF onkogén az EGF/MAPK útvonal fő aktivátora, a melanoma kialakulásáért főként ennek az útvonalnak az aktiválása felel). Először a módszerrel kiválasztottuk a tizenöt legfontosabbnak jelölt ú.n. klasszifikátort (géneket) az EGF/MAPK jelátviteli útvonalból, majd keresztvalidációval megbecsültük, hogy mekkora valószínűséggel tudja a modellünk csupán ezen klasszifikátorok eltéréseire alapozva a megfelelő daganat típusba (BRAF mutációt hordozó daganatok) sorolni a mintáinkat.

Klaszter analízis

A cluster 3.0 programmal végeztünk hierarchikus klaszter analízist majd a TreeView java programot használtuk a klaszterek vizuális megjelenítéséhez. Az analízis során Pearson korrelációt és centroid vagy súlypont módszert alkalmaztunk.

III./4. Géneltérések és kliniko-pathológiai adatok összehasonlító elemzése:

A 7q31 és CCND1 (11q13) kópiaszámok és a vonatkozó kromoszóma kópiaszámok, valamint a primer daganatok klinikai-patológiai paramétereik közötti összefüggések feltárására Fisher egzakt, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney-Wilcoxon tesztek, és logisztikus regressziót alkalmaztunk. Statisztikai interakciót (egyváltozós varianciánálízis) szintén vizsgáltunk annak kiderítésére, hogy a BRAF vagy NRAS mutációs státusz módosítja-e a CCND1 génelterációk hatását a vizsgált kimeneti paraméterekre. A CAV1, TES vagy CCND1 génexpresszió és a primer daganatok klinikai-patológiai paramétereik közötti összefüggéseket Kruskal-Wallis és Mann-Whitney-Wilcoxon tesztekkel határoztuk meg. A CCND1, BRAF és NRAS mRNS szintek közötti korreláció kimutatására Pearson korrelációt alkalmaztunk. Az additív és multiplikatív quickscore kiértékelési módszerek korrelációjához Spearman tesztet használtunk. A túlélési analízist Kaplan-Meier, Log Rank és Cox regressziós tesztekkel végeztük. A 0.05-nél kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az irodalommal összhangban, a több mint kétszeres expresszió szintbeli változást alul- vagy felülexpresszióként definiáltuk.

IV. A PÁLYÁZATI TÁMOGATÁSSAL ELÉRT EREDMÉNYEK

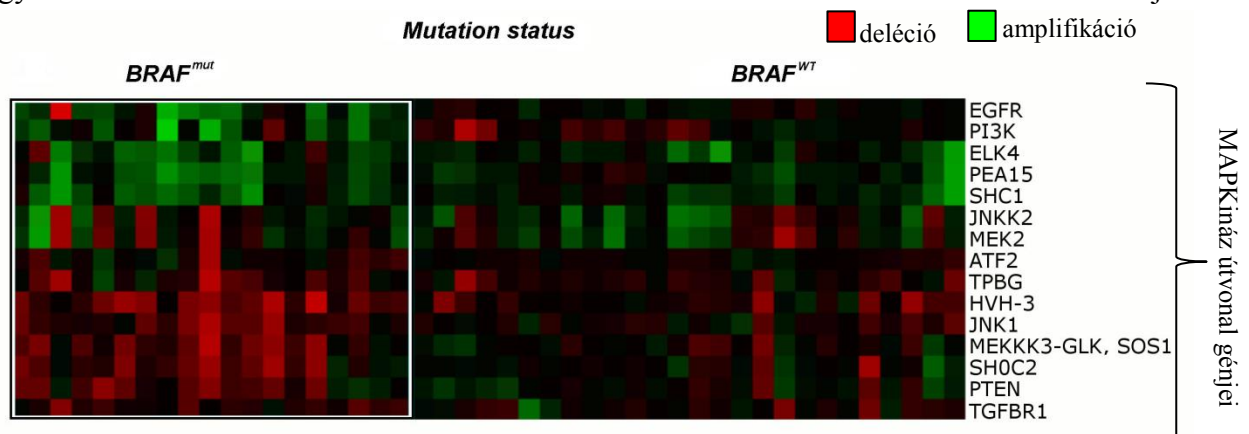
IV./1. Primer melanomák gén kópiaszám eltéréseinek analízise array CGH-val

Array CGH eredményeink szerint a vizsgált primer melanomákban leggyakrabban nagymértékű (>5MB) amplifikáció az 1q, 6p, **7q31**, 8q11- 8q12, 8q21 - 8q24, **11q13**, 15q22- 15q25, 17q25, 19p13, 20p11-20q13 és 22q11-22q13 kromoszóma régiókon, deléció pedig az 1p36 - 1p35, 2q, 4q, 5q22 - 5q23, 6q, 11q14.1 - 11q24.2, 13q14 - 13q31 and 17p13 - 17q21 kromoszóma régiókban és a 9 és 10-es kromoszómákon fordul elő.

Megfigyelésünk szerint a BRAF mutációt hordozó daganatokban szignifikánsan magasabb a kópiaszám eltérések száma a BRAF és NRAS mutációt nem hordozó melanoma szövetekhez képest (Mann-Whitney teszt; $p=0,04$ és $p=0,01$, a DNS többletekre és hiányokra külön-külön). A leggyakoribb nagymértékű amplifikáció a 7q36.3 régióban figyelhető meg, ami ugyancsak a BRAF mutációt hordozó melanomákra jellemző elsősorban. Ezen a régión lokalizálódik a PTPRN2 onkogén, amelynek szerepét kiterjedten vizsgálták emlő daganatokban, hiszen más típusú daganatok esetében a gén termék inhibíciója által már sikeresen tudták csökkenteni a metasztatikus áttétek számát. NRAS mutációkat hordozó primer tumorokra elsősorban a 11q23.3-11q25 lókuszt deléciója volt jellemző. Ezen a lókuszon található az egyik ismert tumorszupresszor gén, az OPCML, mely a receptor tirozin kinázok negatív regulációján át fejt ki hatását. A másik NRAS mutációval összefüggésbe hozható gyakori deléciót a 17p13.3 kromoszómális régióban figyeltük meg, ahol eddig két új tumorszupresszor gént azonosítottak (HIC1 és OVCA1), illetve megfigyelték, hogy ez a lókuszt hemizigóta állapotban sejtciklus deregulációt vált ki és tumorigenezist indukált. Mind a BRAF, mind az NRAS mutációt hordozó melanomák gyakran hordoztak amplifikációt a 6p22.3 (E2F3) és deléciót a 9p21 (CDKN2A) kromoszómális régióban. A két onkogén mutációját nem hordozó vad típusú mintákban gyakori DNS többletet találtunk a 17q24-17q25 kromoszómális szakaszon, illetve DNS hiányt a 4q23-q25 régióban.

IV./2. A BRAF mutáció jelenlétével összefüggésbe hozható gén alterációk felderítése a MAPK jelátviteli útvonalban

A MAPK útvonalból a Random Forest osztályozó segítségével kiválasztottunk 15 BRAF mutációval összefüggésbe hozható gén kópia szám eltérést számos ismert (pl: EGFR, PI3K, JNKK2) és kevésbé ismert (pl: PEA15, ELK4, SHC1) onkogénnel. Továbbá detektáltunk egy érdekes deléciós mintázatot, amely a BRAF mutáció jelenlétével összefüggésbe hozható (1. Ábra). Ezek közül kiemelném a PTEN, JNK1 és HVH-3 ismert tumorszupresszor gének együttes delécióját.



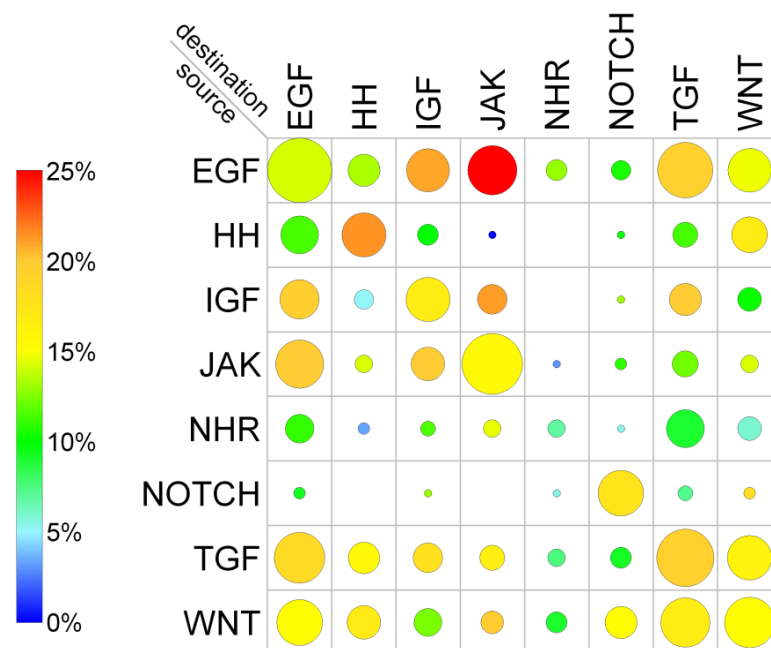
1. Ábra A BRAF mutációval együttesen megjelenő, a receptor tirozin kinázhoz kapcsolható jelátviteli útvonalakban szerepet játszó gének kópia szám eltérései

A PTEN egy jól ismert tumorszupresszor gén melanomákban, ellenben a HVH3 és JNK1 gének melanomában betöltött szerepéről igen kevés információ áll rendelkezésre. Az irodalomban fellelhető legújabb eredmények alapján a HVH3 génről ismert, hogy az ERK2

gén inaktivációjaért és specifikus lokalizációjaért felelős, melyet célzottan támadva már sikerült a daganatok növekedését sikeresen gátolni. A JNK1 $-/-$ transzformált egerekben pedig spontán belső szervei daganatok kialakulását detektálták.

A jelátviteli útvonalak közötti interakciók eltéréseinek vizsgálata BRAF mutációt hordozó primer melanomákban

Egy jelátviteli útvonalban, illetve útvonalak közötti kapcsolatot biztosító jelátviteli interakciót akkor tekintettünk sérültnek, ha legalább az interakcióban résztvevő egyik fehérjét kódoló gén régiójában amplifikációt vagy deléciót azonosítottunk. Megfigyeltük, hogy a BRAF mutációt hordozó daganatokban, a MAPK-JAK jelátviteli útvonalak közötti jelátviteli interakciók gyakrabban sérültek, mint a vad típusú BRAF gént tartalmazó melanomákban. Hasonló mintázatot találtunk a MAPK-IGF és JAK-IGF útvonalak között is. Továbbá rávilágítottunk a Hedgehog (HH) útvonal alterációinak jelentőségére is a BRAF mutáns melanomákban (2. Ábra).



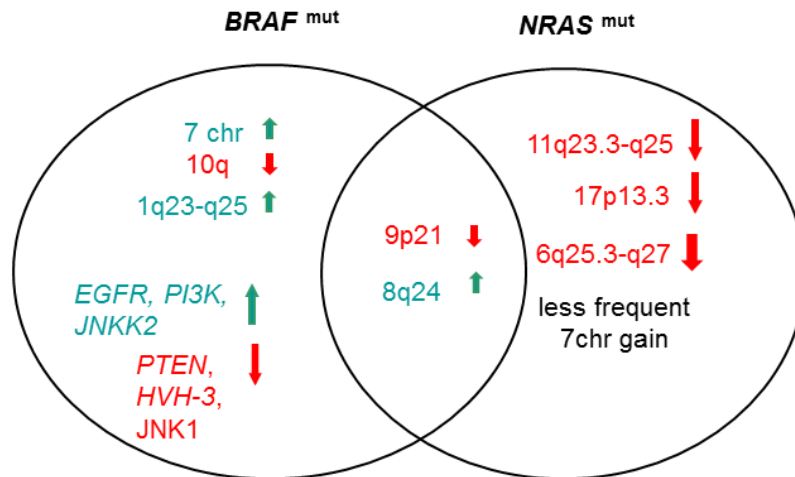
2. Ábra A genetikai eltéréseket különböző jelátviteli útvonalakban szerepet játszó génekhez kapcsolása Signalink programmal. A BRAF mutációt hordozó daganatokban leggyakrabban az EGF-JAK szignalizációs útvonalak közötti interakcióban résztvevő gének sérülnek. a jelátviteli interakciót sérültnek definiáltuk, ha az interakcióban résztvevő egyik fehérjét kódoló gén régiójában amplifikációt vagy deléciót azonosítottunk

ArrayCGH redményeink alapján megállapíthatjuk, hogy:

- A BRAF mutációt hordozó daganatokban a leggyakoribb eltérés az 1-es kromoszóma hosszú karjának (1q23-1q25), illetve a teljes 7-es kromoszómának a DNS-többlete és a 10-es kromoszóma hosszú karjának (10q213-10q26) hiánya. Az NRAS mutációt hordozó

daganatokra a 11q22.3-11q25 régiót érintő deléció a jellemző. Hierarchikus klaszter analízis alapján a 10-es kromoszóma hosszú karjának deléciója szignifikánsan gyakrabban fordult elő a *BRAF* mutációt hordozó és előrehaladott stádiumú primer daganatokban.

- Korrelációs analízissel további kromoszóma lókuszokat azonosítottunk, amelyek genetikai eltérései nagy gyakorisággal, együttesen fordulnak elő a különböző genotípusú primer daganatokban.



3. Ábra a két mutációs alcsoporthoz tartozó leggyakoribb kópiaszám eltérések összefoglalása. A felfelé mutató nyílak az adott kromoszómális régió vagy gén kópiaszám növekedését/amplifikációját vagy csökkenését/delécióját jelzik.

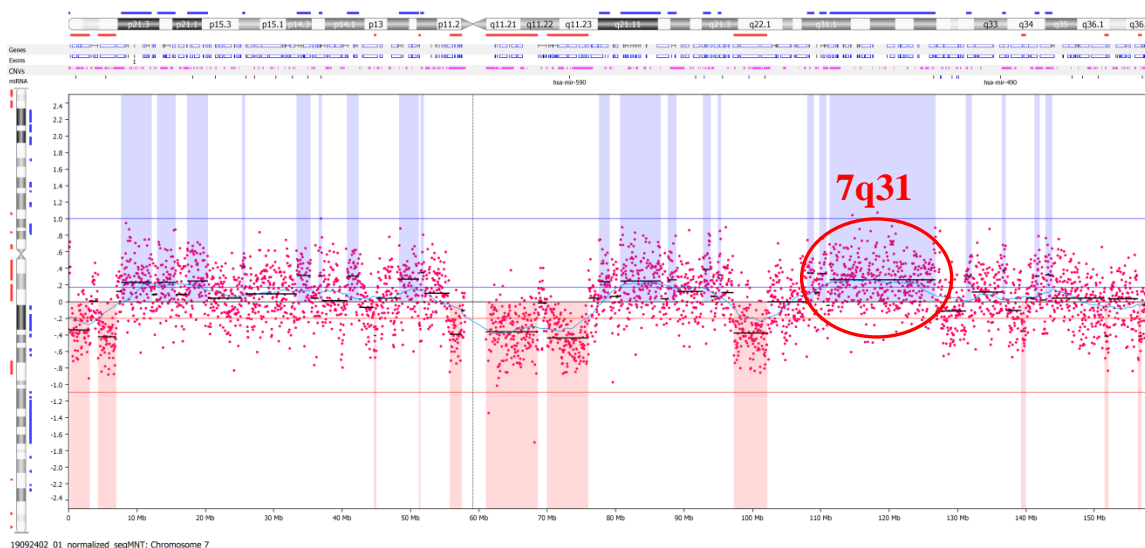
arrayCGH eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy annak ellenére, hogy az *NRAS* és a *BRAF* onkogén aktivációs mutációi ugyanazon szignáltranszdukciós útvonalat aktiválják, a primer melanomák tumorigenezise során eltérő genetikai alterációkkal kooperálnak (3. Ábra). Ez a melanoma progresszió során tapasztalt jelenség rendkívül figyelemre méltó, hiszen arra utalhat, hogy a *BRAF* és *NRAS* mutációk egyfajta vezérlő erőként funkcionálnak az alternatív genetikai útvonalakat feltételező melanomagenesis során. Ezen eltérések felfedezése új specifikus terápiás targetek azonosítására nyújt lehetőséget a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett.

IV./3. Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák FISH analízise kromoszóma centroméra, valamint 7q31 lokusz specifikus DNS próbákkal

A 7-es kromoszóma és a 7q31-es régió FISH-el kimutatott számbeli eltérései, kiértékelési módszerek

Vizsgálataink során tanulmányoztuk az arrayCGH-el gyakran detektált 7q31 lokusz amplifikáció (4. ábra), valamint a 7-es kromoszóma számbeli eltéréseit, ezek kapcsolatát a sporadikus malignus melanomák klinikai-patológiai paramétereivel. Az interfázisos FISH kísérleteket friss-fagyasztott tumorokból készített lenyomat preparátumokon végeztük, ahol a minta készítés során a szöveteket egy előzőleg szilánnal kezelt tárgylemezhez érintve teljes,

ép sejteket kaptunk. A preparátumokon ezt követően ellenőriztük az adott minta ploiditás mintázatát (1, 3, 6, 7, 8, 9 és 10-es kromoszóma specifikus próbák) a tumorsejt tartalom megállapítására. Azokat a mintákat, melyekben legalább 3 kromoszóma a sejtek több mint 30%-ában nem mutatott aneuszómiát, kizártuk a későbbi analízisekből. Az alkalmazott gyári FISH próbákat egészséges humán vérből nyert normál limfociták kromoszóma preparátumán teszteltük, ahol a normál 2 kromoszóma/2 lokusz kópia aránytól való eltérés kevesebb, mint 1% volt.



4. ábra – Reprezentatív array CGH profil a 7-es kromoszómán melanómákban előforduló eltérésekről. A 7q31-es lokusz genom eltéréseit piros kör emeli ki. Kék színű sávokban a kópiaszám többletet, míg piros sávokban a kópiavesztéseket ábrázoltuk. Az ábra felső részén elhelyezkedő annotációs rész szemlélteti a gén, exon, CNV (kópiaszám variabilitás; a Center for Applied Genomics' Database of Genomic Variants adatbázis alapján) és miRNS adatokat, amennyiben elérhetőek. Az y tengely ábrázolja az egyes próbák medián log ratioját, míg az x tengelyen a régiók Mb távolsága van feltüntetve a kromoszóma p kar végétől.

A FISH eredmények kiértékelése

A. kópiaszám kategória

A centromérához viszonyított 7q31 kópiaszám értékek, ahol az egyes tumor minták kategorizálása minden esetben a domináns 7q31 kópiaszám kategória alapján történt. A módszer előnye, hogy kizárható az ún. látszólagos amplifikáció jelensége, ahol a teljes kromoszóma többlete vonja maga után a régió többletét, így a valós amplifikáció mértékét lehet meghatározni. Ugyanakkor a domináns sejtpopuláció alapján történő besorolás elfedheti a minor populációk hatását, ami nehezkesebbé teheti a heterogénebb minták kezelését.

Összesen 4 kópiaszám kategóriát alkottunk. Amelyik minta nem felelt meg a felállított kritériumoknak a vizsgált régióra, normálnak vettük. A kópiaszám kategóriák az alábbiak voltak:

1. Deléció: a lokusz kópiaszáma kevesebb a hozzátartozó kromoszóma kópiaszámánál a sejtek $\geq 10\%$ -ában.

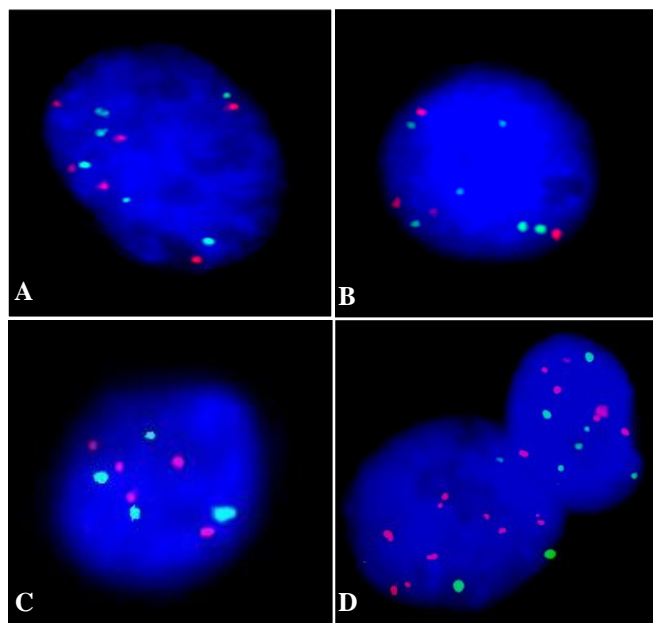
2. Látszólagos amplifikáció: a kromoszóma kópiaszáma megegyezik a lokusz kópiaszámával, de több mint 2.
3. Kismértékű amplifikáció: a lokusz kópiaszám maximum 5x nagyobb a kromoszóma kópiaszámánál, de nem haladja meg a sejtenkénti 10 kópiát.
4. Nagymértékű amplifikáció: a lokusz kópiaszám több mint 5x nagyobb a kromoszóma kópiaszámánál, és meghaladja a sejtenkénti 10 kópiát a sejtek $\geq 10\%$ -ában.

B. kópiaszám index (CNI)

Az adott mintában számolt összes szignálszám sejtszámra korrigált értéke, mely megadja az adott mintában a sejtenkénti átlagos lokusz kópiaszámot függetlenül a kromoszóma számától. A módszer előnye, hogy képet kapunk a valós géntöbbletről, mely végső soron befolyással lehet az itt lokalizálódó gének kifejeződésére.

C. 7q31/7c arány

A lokusz és a centroméra adott mintában leszámolt össz szignálszámainak hányadosa. A kapott érték egy folytonos változóként kezelhető arányszám, mely által korrigálható a kategorizálásnál fellépő fent említett hiba. Viszont nehezen kezeli azokat az eseteket, melyekben a kromoszóma és a lokusz is 10 feletti sejtenkénti szignálszámmal jellemezhető. Mivel a 10 kópia már jelentős többletnek mondható, ezért az e feletti értékeket egységesen „több mint 10”-ként regisztráltuk. Azonban az úgynevezett „double-minute” kromoszómák gyakori jelenléte a régió kromoszóma számát meghaladó többletére utalt, így ezek az esetek a nagymértékű amplifikáció kategóriájába estek az 1 körüli arányszám ellenére.



5. ábra - 7q31 kópiaszám eloszlás interfázisos melanoma sejtekben. A 7-es kromoszóma centroméra specifikus próba SpectrumGreen jelölt (zöld szignál), míg a 7q31 lokusz specifikus próba SpectrumOrange jelölt (piros szignál). A sejtmagok DAPI-val festettek (kék szignál).

A.) 7q31 látszólagos amplifikáció, B.) 7q31 deléció, C.) 7q31 kismértékű amplifikáció és D.) 7q31 nagymértékű amplifikáció, „scattered” típusú

Összesen 75 primer melanoma mintát választottunk ki FISH analízishez (34 nő és 41 férfi). A betegek átlagos életkora $61,9 \pm 13,3$ év volt (33-87 év). A betegek 9%-a (N=7) esett az 5 éves követési időn belül, így mintáik nem vettek részt az áttétképzéshez és túléléshez

kapcsolódó vizsgálatokban. A betegek, primer tumor diagnózisát és műtéti eltávolítását követő átlagos túlélése $4,1 \pm 3,3$ év volt (0,04-14,5 év). Mind a 7-es kromoszóma, mind a 7q31-es régió sejtenkénti kópiaszáma 1 és több mint 10 közé esett. A primer tumorok 79%-ában észleltünk 7-es kromoszóma aneuszómiát, míg a minták 95%-a mutatott valamilyen 7q31 kópiaszám alterációt. A 7-es kromoszóma CNI 1,8 - 13,0 közé, míg a 7q31 CNI 1,2 - 13,3 közé esett. A 7q31 lokusz CNI-e jól korrelált a 7-es kromoszóma kópiaszám eltéréseivel ($p < 0,001$, Fisher egzakt teszt). A 7q31-es régió FISH-el talált jellegzetes kópiaszám eltéréseit az 5. Ábrán foglaltuk össze.

A lokusz 7-es kromoszómához viszonyított extra kópiáját a vizsgált melanomás esetek 71%-ában figyeltük meg ($N=53$), míg a minták 19%-a ($N=14$) lokusz delécióval volt jellemezhető. Nagymértékű amplifikációt 9 esetben (12%) detektáltunk. Egy minta kivételével, ezek a melanómák előrehaladott stádiumú, agresszív fenotípusú daganatok voltak, melyek távoli áttéteket képeztek, főként a tüdőbe és az agyba.

Primer melanómák klinikai-patológiai paraméterei és a 7q31 kópiaszám eltérései közötti kapcsolat

Az elemzés során elsősorban az AJCC (American Joint Committee on Cancer) által a rossz prognózis ismert prediktoraiként definiált paraméterekre fókuszáltunk. Ezek közé tartozott a felszíni kifelégyesedés, áttétképzés, Breslow tumor vastagság, szövettani altípus és a melanoma specifikus halálozás. A vizsgálat paraméterek listáját kibővítettük az áttétképzés helyével, valamint a krónikus napsugárzásnak való kitettséggel is, mivel ezek fontos információval szolgálhatnak egyrészt a metasztatizáló hajlam jellegéről (limfogén és/vagy hematogén úton történik), másrészt indirekt módon az eltérések UV sugárzással való összefüggéséről.

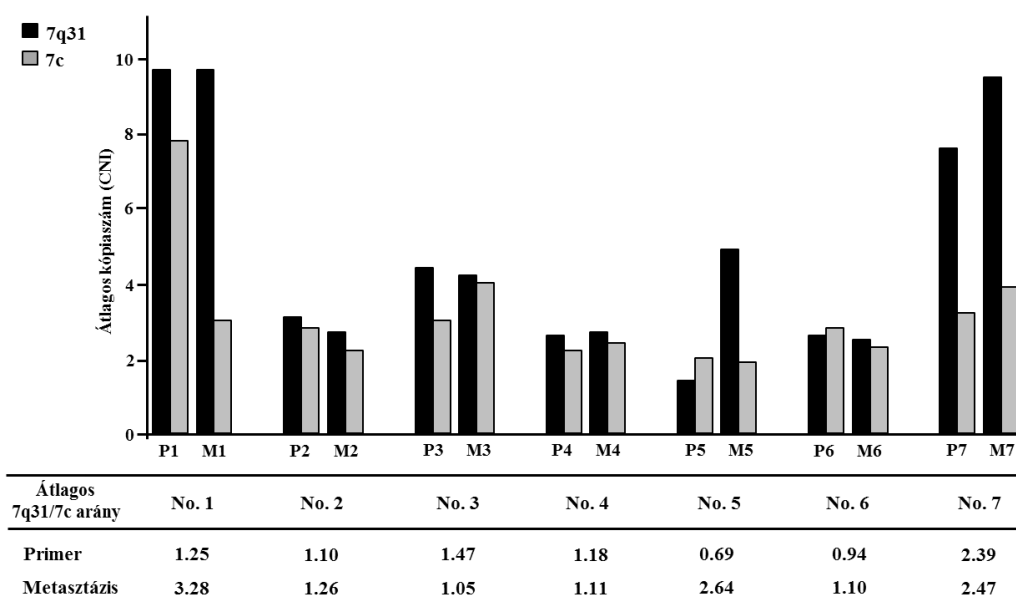
A krónikus napsugárzásnak való kitettséget, a klinikai gyakorlatnak megfelelően a primer tumor anatómiai elhelyezkedése alapján határoztuk meg (alkar, lábszár és fej, kivéve a hajas fejbőr). Az áttétképzés és túlélés analízise során minimum 5 éves követési időt alkalmaztunk, mivel az irodalom alapján az áttétes betegek többsége a primer tumor megjelenését követő 3 éven belül képez metasztázist.

A 7q31-es régió kópiaszám indexe szignifikánsan magasabb volt azokban a primer léziókban, melyeket metasztatizáló hajlam ($p=0,012$) és kifelégyesedő felszín ($p=0,002$) jellemezte, valamint a betegség 5 éven belül halálhoz vezetett ($p=0,048$). Továbbá, az 50 évnél idősebb betegek szintén emelkedett 7q31 kópiaszámmal voltak jellemezhetőek a fiatalabb korcsoportokhoz viszonyítva ($p=0,038$). Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a 7q31-es régió többlete primer melanómákban rossz prognózissal társul. A régió eltérések és a klinikai-patológiai paraméterek közötti kapcsolat vizsgálatának eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A FISH vizsgálatba bevont tumor minták között 7 esetben volt olyan primer tumor, melynek metasztázisa (lokális nyirokcsomó) is elérhető volt a 7q31-es régió kópiaszám változásainak tanulmányozására. FISH eredményeinket a 6. ábrán foglaltuk össze. A tumor párok átlagos kópiaszáma nem tért el szignifikánsan, ami arra enged következtetni, hogy a 7q31-es régió eltérései sok esetben már a primer tumorban megjelennek és fennmaradnak az áttétképzést követően is.

1. táblázat – A 7q31 kópiaszám eltérések és a primer melanomák klinikai-patológiai paramétereinek közötti összefüggés.

Paraméter	Mintaszám	Átlagos 7q31 kópiaszám index	±SD ¹	p ²
Ulceráció				0,002
nem	30	3,0	1,3	
igen	45	4,7	2,6	
Áttétképzés				0,012
nem	20	3,1	1,5	
igen	48	4,6	2,6	
Áttétképzés helye				0,108
bőr/nyirokcsomó	16	3,5	2,0	
távoli szervi	18	5,1	2,5	
többszörös ³	14	4,8	2,9	
Breslow vastagság (mm)				0,291
≤2,0	21	3,3	1,5	
2,0 – 4,0	13	4,4	2,5	
≥4,0	41	4,3	2,6	
Szöveti altípus				0,477
SSM ⁴	43	3,8	2,1	
NM ⁵	32	4,4	2,6	
Beteg túlélése				0,048
életben van	28	3,5	1,7	
elhunyt	40	4,5	2,7	
Krónikus napsugárzásnak kitettség				0,627
nem	45	4,0	2,1	
igen	30	4,1	2,6	

¹standard deviáció; ²kétoldali Mann-Whitney-Wilcoxon vagy Kruskal-Wallis teszt; ³bőr/nyirokcsomó és távoli áttétet is képzett; ⁴felszínesen terjedő melanoma; ⁵noduláris melanoma

**6. ábra** – A 7q31-es régió és 7-es kromoszóma kópiaszám eltérései primer melanomákban (P) és belőlük származó nyirokcsomó metasztázisokban (M). Az oszlop diagram alatti táblázatban mintapáronként vannak feltüntetve az egyes mintákra jellemző 7q31/7c arányszámok.

Bár az 5-ös mintapárnál csak a metasztázisban figyelük meg 7q31 eltérését, mely azzal magyarázható, hogy a primer minta heterogén sejtpopulációk együttese volt a vizsgált régiót illetően (lokusz deléción és amplifikáció együttes előfordulása), így az egyes sejtpopulációk eltérései átlagolódtak. A 7q31/7c arányra 3 mintapár mutatott eltérést (1, 5 és 7). Az első és ötödik tumor párnál a 7q31/7c arány jelentősen nagyobb volt az áttétben, a hetes mintapárnál mind a primer tumorra, mind a metasztázisra magas gén/centroméra arány volt jellemző.

IV./3A CAV1 és TES gének mRNS és fehérje expressziós eltérései és kapcsolata a 7q31 kópiaszám alterációkkal

A 7q31-es régió egy közel 20 millió bp-nyi szekvencia a 7-es kromoszómán, mely 424 gént foglal magába. A daganat progresszió során kialakuló mutációk szempontjából kitüntetett a FRA7G törékeny pont, melynek közvetlen szomszédságában lokalizálódik a CAV1 és TES gén. Pozíciójukból kifolyólag így ezek a gének potenciális melanoma markerekként szolgálhatnak. Korábbi tanulmányok a CAV1 multifunkcionális vázfehérje vitatott szerepét mutatták ki számos humán daganat fejlődésében, ahol a molekula daganat invázióban és áttétképzésben betöltött szerepét igyekeztek feltárni. Míg a TES, a fokális adhéziók kulcs molekulájaként az invázióban és a tumoros sejtek kihorgonyzásában tölthet be szerepet. Molekuláris szinten, melanomákban azonban még kevésbé vizsgált génekről van szó. Ezért vizsgálataink ezen szakaszában a CAV1 és TES gének génexpressziós változásainak feltérképezésére fókuszáltunk, a melanoma progresszióban betöltött szerepük mélyebb megértésére.

Összesen 33 friss-fagyasztott primer melanoma mintán volt lehetőségünk a CAV1 és TES mRNS expresszió meghatározására, melynek eredményeit a primer tumorok klinikai-patológiai paramétereivel való összefüggések tükrében a 2. táblázatban foglaltunk össze.

A CAV1 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt vastag daganatokban ($p=0,002$), míg a TES mRNS szintek eltérést mutattak a különböző helyen lokalizálódó áttétekkel rendelkező primer tumorokban ($p=0,011$).

Fehérje szinten összesen 60 primer melanoma mintán volt lehetőségünk meghatározni a CAV1 és TES expressziós eltéréseket szöveti microarray segítségével. A multiblokkok készítése során az előzőleg dermatopatológusok segítségével validált minták tumor sejt dús területei kerültek kivágásra. Ahol a szövet nagysága erre lehetőséget adott, a szövetet 3 minta „spot” reprezentált az arrayken. Ezáltal feltérképezhettük a tumoron belüli heterogenitás mértékét is, mely főként a vastag daganatok jellemzője. Az elkészült multiblokkoknál az immunhisztokémiai (IHC) festések előtt ellenőriztük, hogy a megfelelő részek kerültek e kivágásra. Az IHC eredményeket a fehérje festődés intenzitás mértékét figyelembe vevő 4 fokozatú skála segítségével értékeltük ki, ahol 0: nincs festődést; 1+: határozott, de enyhe festődést; 2+: közepes mértékű festődést; és 3+: erős festődést jelentett. A mintánkénti triplikátumok egyedi eredményeit egyetlen értékévé összesítettük. A CAV1 –re 51, míg a TES-re 55 mintát tudtunk kiértékelni, 46 átfedő minta volt mindkét fehérjére.

A klinikai-patológiai paraméterekkel való összefüggések statisztikai analízise során az alábbi eredményeket kaptuk. Hat vastag ($\geq 4,0$ mm) és előrehaladott stádiumú lézió mutatott magas intratumorális heterogenitást a morfológiailag különböző sejtek között (pl. habos vs. orsó sejtek). A melanoma szöveteket a CAV1 fehérjére elsősorban membrán pozitivitás és

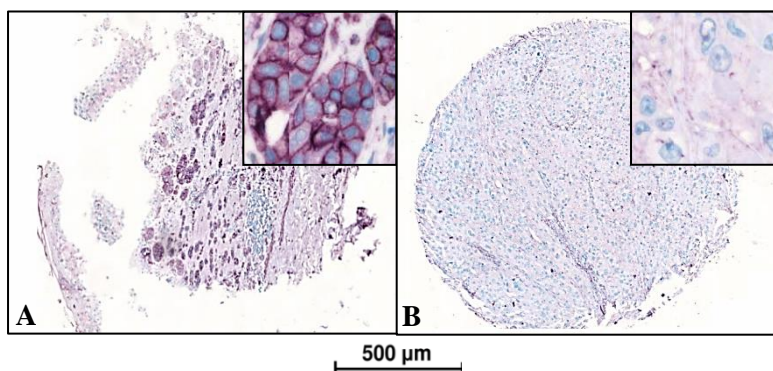
gyenge diffúz citoplazma pozitívitas jellemezte, míg a TES gyakran képezett plakkokat a membránban, melyet gyenge plazma pozitívitas is kísért. A CAV1 fehérje valamilyen fokú expresszióját a primer melanomák 83%-ában detektáltuk, mely egyedül a Breslow vastagsággal mutatott szignifikáns összefüggést ($p=0,038$; Fisher's egzakt teszt). A vastagság növekedésével csökkent a CAV1 szint (7. ábra), mely feltételezett tumorszuppresszor funkciójára utalhat, ugyanakkor a vékony minták egy szubpopulációjában megfigyelhető fehérje hiány a molekula összetett szerepét világítja meg. TES fehérje expresszió az esetek 76%-ában jelentkezett, azonban egyetlen vizsgált paraméterrel sem találtunk szignifikáns összefüggést.

2. táblázat – A relatív CAV1 és TES mRNS szintek és a primer melanomák klinikai-patológiai paramétereinek közötti korreláció

Paraméter		Mintaszám	CAV1	p^1	TES	p
Altípus ²	SSM	20	$4,71 \pm 0,41$	0,207	$1,64 \pm 0,41$	0,870
	NM	13	$2,95 \pm 1,69$		$1,49 \pm 0,49$	
Breslow vastagság (mm)	<4,0	21	$5,65 \pm 2,84$	0,002	$1,97 \pm 0,43$	0,063
	$\geq 4,0$	12	$1,15 \pm 0,88$		$0,91 \pm 0,35$	
Áttétképzés ³	nem	16	$2,62 \pm 0,70$	0,067	$2,09 \pm 0,51$	0,191
	igen	17	$5,42 \pm 3,60$		$1,14 \pm 0,34$	
Beteg túlélése ³	életben van	23	$3,01 \pm 0,96$	0,125	$1,96 \pm 0,42$	0,057
	elhunyt	10	$6,48 \pm 5,93$		$0,78 \pm 0,24$	
Áttétképzés helye	bőr/nyirokcsomó	6	$3,96 \pm 3,38$	0,702	$1,89 \pm 0,90$	0,011
	távoli szervi	5	$12,13 \pm 11,91$		$1,10 \pm 0,21$	
	többszörös	6	$1,27 \pm 0,56$		$0,42 \pm 0,12$	

¹Mann-Whitney-Wilcoxon vagy Kruskal-Wallis teszt; ²SSM: felszínesen terjedő melanoma, NM: noduláris melanoma; ³minimum 5 éves követési idő; a szignifikáns p értékek boldval vannak jelezve

Tizenhét primer melanománál volt lehetőség a 7q31 kópiaszám alterációk, CAV1 és TES mRNS és fehérje expressziós szintek közötti kapcsolat elemzésére. Az eredmények szerint a lokusz többlete nem vagy gyenge korrelációban áll az itt lokalizálódó CAV1 és TES gének mRNS és fehérje szintjeivel. Ennek egyik oka lehet a 7q31 heterozigóta vesztese, így a fennmaradó gén kópia még elegendő lehet a zavartalan mRNS szintézishez. Az is előfordulhat, hogy az amplifikáció nem a teljes lokuszt érinti. A kérdés pontos megválaszolásához nagyobb átfedő mintapopuláció vizsgálatát tervezzük.



7. ábra – CAV1 fehérje expresszió és a Breslow vastagság közötti összefüggés. A.) Erős fehérje kifejeződés egy III-as stádiumú, vékony mintában, B.) gyenge fehérje kifejeződés egy IV-es stádiumú, vastag primer melanomában. A CAV1 fehérje VIP festéssel, míg a sejtmagok metilzölddel vannak jelölve.

Összességében eredményeink a CAV1 molekula lehetséges kettős szerepére utalnak. Egyrészt a csökkent fehérje expresszió a tumor sejtek fokozott proliferációs képességével vagy a kaszpáz-3 útvonal sérülése révén az apoptózissal szembeni rezisztenciával társulhat. Azonban a fehérje teljes elvesztése a daganatos szövet csökkent neovaszkularizációját és a tumor szuppresszióját is eredményezheti a citokin jelátvitel gátlása vagy a fokális adhézis domén szerkezet stabilizálása által. Ugyanakkor a CAV1 számos interakciós partnerrel rendelkezik. Ezen partner molekulák alterációi szintén hatással lehetnek a CAV1 melanoma progresszióban betöltött szerepére, hasonlóan a Galectin-3-hoz, mely képes felülrni a CAV1 tumor szupresszor hatását pajzsmirigy rákokban, migrációt eredményezve. Végül, a fehérje variánsai is (vad típusú α és csonka β forma) eltérő funkciójúak. A csonka forma N-terminális végéről hiányzik egy Tyr-14 régió, mely foszforilációt követően elősegítené a mitokondriális apoptózist. A TES esetében a molekula eltérései általánosságban nem mutattak szignifikáns összefüggést a primer léziók metasztatizáló hajlamával. Azonban az mRNS szint változása az áttétképzés helyének függvényében megerősíti azt a hipotézist, hogy a TES valamilyen módon hatással lehet a melanoma invázióra.

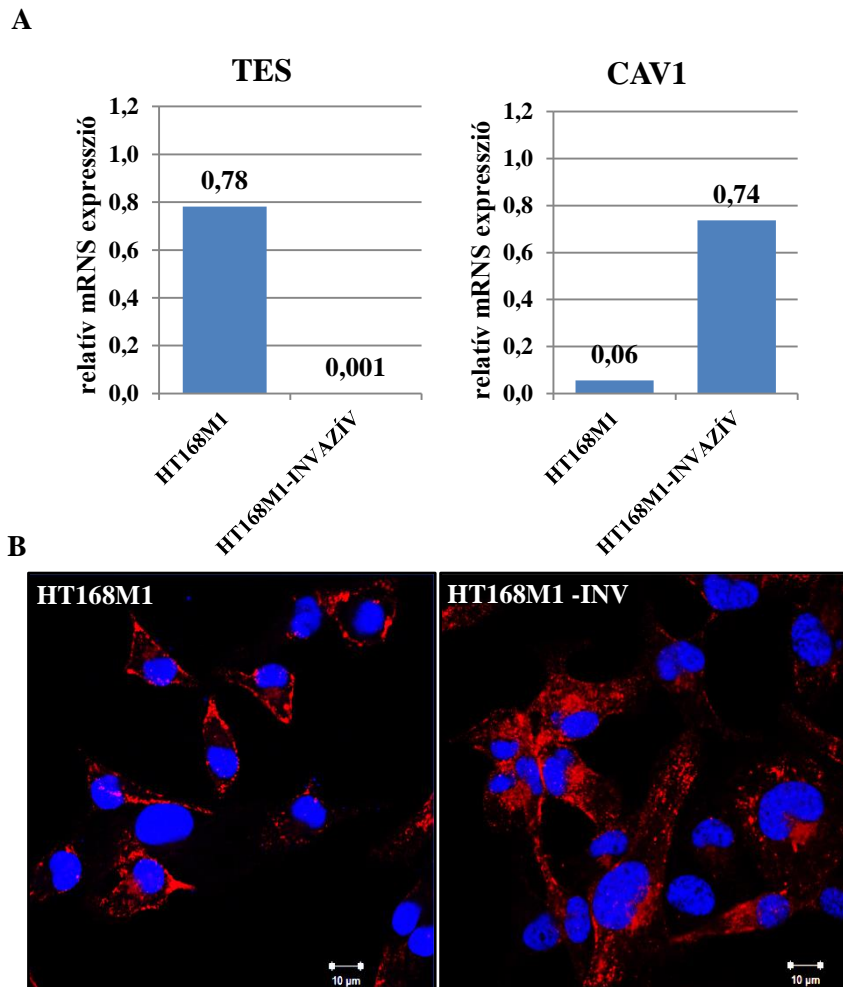
IV./3B A 7-es kromoszóma és a 7q31-es lokusz kópiaszám eltérései, a CAV1 és TES gének expressziója humán melanoma sejtvonalakban

A szöveti mintákon kapott eredmények kiegészítéseként, 7 eltérő biológiai viselkedéssel jellemzett melanoma sejtvonagra (WM35, WM983A, WM983B, HT199, A2058, HT168 és HT168M1) is meghatároztuk a 7q31-es lokusz kópiaszám eltéréseit, valamint a CAV1 és TES gének mRNS és fehérje expressziós szintjét. Az alkalmazott melanoma sejtvonalak fő jellemzői az alábbiak voltak:

- WM35: Egy 24 éves nő RGP fázisú, nem metasztatikus, SSM altípusú, lapocka/nyak lokalizációjú primer daganatából származik, melynek Breslow vastagsága 0.69 mm volt.
- WM983A: Egy 54 éves férfi VGP fázisú, agresszív áttétképző, hasi lokalizációjú primer daganatából származik, melynek Breslow vastagsága 25 mm volt.
- WM983B: Az előző beteg nyirokcsomó áttétéből származó sejtvonala.
- A2058-HT168-HT168M1: Egy melanoma modell rendszer tagjai. Az eredeti A2058 sejtvonala egy 43 éves férfi amelanotikus melanoma nyirokcsomó áttétéből származik. A HT168 az A2058 nude egérbe történt beoltását követően kialakult xenograftból ered. Míg a HT168M1 a HT168 immunszuppresszált egér lépébe történt *in vivo* adaptációjából származik.
- HT199: Egy 23 éves nő RGP fázisú, metasztatikus, NM altípusú primer daganatából származik. A tumor máj áttétet képezett SCID egérben.

A lokusz kismértékű amplifikációja és deléciója minden vizsgált sejtvonalba kimutatható volt különböző frekvenciával. A CAV1 jelentősen fokozott mRNS expressziója a 7q31 nagymértékű amplifikációval függhet össze, mely eltérés az agresszív fenotípusú sejtvonalakban (A2058 és HT168M1) volt megfigyelhető. A fehérje kifejeződést tekintve, eltérő mértékben, de valamennyi vizsgált sejtvonala a CAV1 magas expresszióját figyeltük meg. Hasonlóan a szöveti eredményekhez, azonban itt sem találtunk összefüggést a 7q31

eltérések és expressziós szintek között. A TES mRNS expresszió minden sejtvonalban a kontroll melanocitákhoz viszonyítva jelentős mértékű volt, mely együtt járt a fehérje szint emelkedésével. A WM35, HT199 és WM983B sejtvonalaknál az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit western blottal is megerősítettük.



8. ábra – CAV1 és TES génexpresszió nagymértékű invazivitással jellemzett sejtvonalból (HT168M1) szelektált invazív sejtklónokban az eredeti sejtvonalhoz viszonyítva. (A) TES és CAV1 relatív mRNS expresszió a HT168M1 anyai sejtvonalban és a szelektált invazív sejtekben. A relatív, GAPDH normalizált értékeket melanocita kontrollhoz viszonyítva adtuk meg, Livak módszert alkalmazva. (B) HT168M1 és HT168M1-INV sejtek konfokális mikroszkópos felvétele a CAV1 fehérje molekula immunfluoreszcens jelölését követően (piros fluoreszcencia). A sejtmagokat DAPI festékkel jelöltük (kék fluoreszcencia).

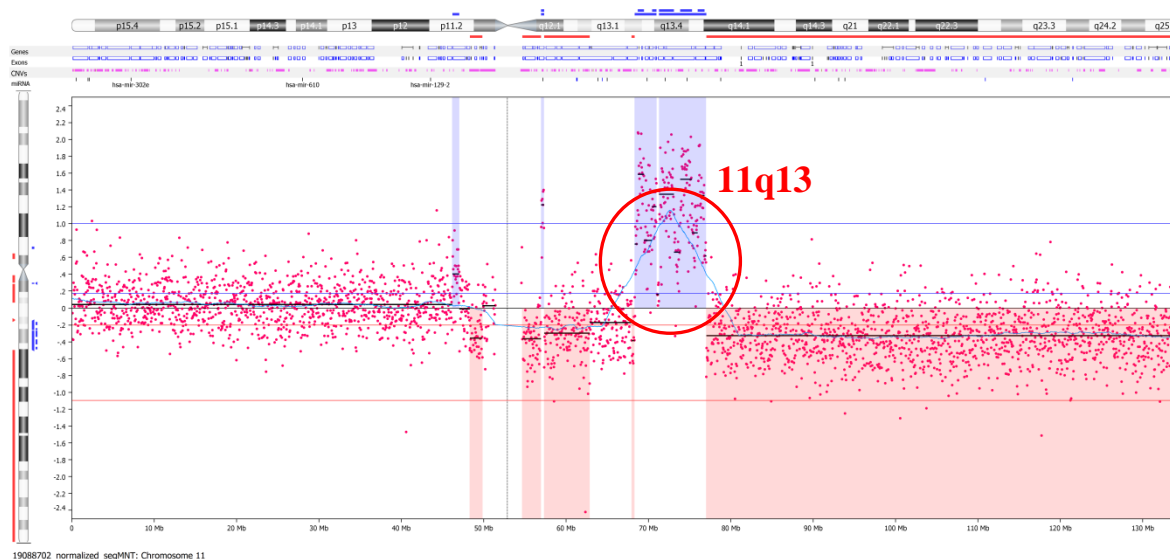
Mivel a CAV1 és TES biológiai funkciója is kapcsolódhat a daganat sejt invázióhoz, ezért vizsgáltuk a molekulák expressziós változásait invazív (N=13) és nem invazív (N=7) humán melanoma sejtvonalokban. Az invazivitás meghatározásához Matrigel inváziós kamrákat alkalmaztunk, mely egyedi sejtes inváziót tesz lehetővé. Eredményeink alapján a TES mRNS szintje nem különbözött számottevően a két csoport között, viszont invazív sejtvonalak közel egyharmadában figyeltünk meg CAV1 overexpressziót, szemben a downregulált vagy normál CAV1 mRNS szintet mutató nem invazív sejtvonalakkal. Ezt követően a nagymértékű invazivitást mutató HT168M1 sejtvonalból szelektáltuk az invazív sejt klónokat, majd összehasonlítottuk ezen sejtek mRNS expressziós mintázatát az eredeti sejtvonallal. Az

immunfluoreszcens jelöléssel vizsgált fehérje expresszió az eredeti sejtvonalnál a molekulára jellemző sejtmembrán lokalizációt mutatott, míg a szelektált invazív sejt populációban a membrán mellett a plazmában is detektáltunk festődést, ami fokozott expresszióra utal. A CAV1 molekula általános expresszióbeli növekedése, feltehetőleg heterogén funkciójának köszönhető, melynek egyik aspektusa a sejtek motilitásának szabályozása. Míg a TES esetében az eredeti sejtvonalban megfigyelt normál expresszió a szelektált invazív sejtekben jelentősen lecsökkent (8A. ábra), ami a molekula sejtkapcsolatok stabilizálásban betöltött szerepét támasztja alá. Így a TES mRNS expressziós csökkenése valóban hozzájárulhat a daganatsejtek egyedi sejt inváziójához.

IV./4 Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák FISH analízise kromoszóma centoméra, valamint CCND1 gén specifikus DNS próbákkal, kapcsolata a BRAF és NRAS gének mutációs státuszával

IV./4A A 11-es kromoszóma és a CCND1 gén kópiaszám eltérései

Vizsgálataink során célunk volt a 11q13-as lokusz (CCND1 onkogén) amplifikációs mintázatának elemzése (9. ábra), párhuzamosan a 11-es kromoszóma számbeli eltéréseivel, valamint kapcsolatukat a sporadikus malignus melanomák klinikai-patológiai paramétereivel, valamint a primer melanoma minták BRAF^{V600} és NRAS^{Q61} mutációs státuszával.

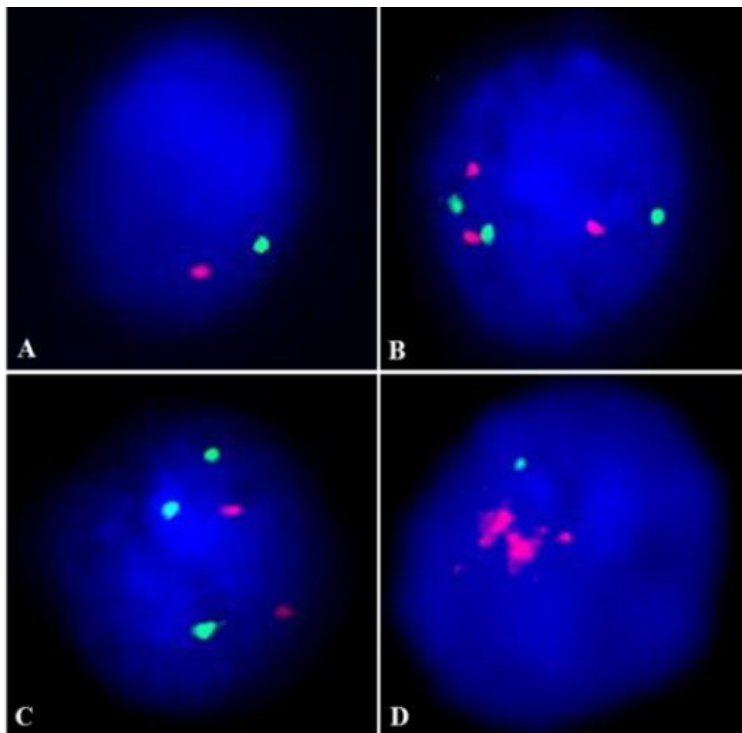


9. ábra – Reprezentatív array CGH profil a 11-es kromoszómán melanomákban előforduló gyakori kópiaszám eltérésekről. Az ideogramon piros körrel jelölt a CCND1 onkogént tartalmazó 11q13-as lokusz amplifikációja. Kék szín reprezentálja a kópiaszám többletet, míg piros a kópiavesztést. Az ábra felső részén elhelyezkedő annotációs rész ábrázolja a gén, exon, CNV (kópiaszám variabilitás; a Center for Applied Genomics' Database of Genomic Variants adatbázis alapján) és miRNS adatokat, amennyiben elérhetőek. Az y tengely ábrázolja az egyes próbák medián log ratioját, míg az x tengelyen a régiók Mb távolsága van feltüntetve a kromoszóma p kar végétől.

Az interfázisos FISH kísérleteket friss-fagyasztott tumorokból készített lenyomat preparátumokon végeztük. A preparátumokon ezt követően ellenőriztük az adott minta ploiditás mintázatát (1, 3, 6, 7, 8, 9 és 10-es kromoszóma specifikus próbák) a tumorsejt

tartalom megállapítására. Azokat a mintákat, melyekben legalább 3 kromoszóma a sejtek több mint 30%-ában nem mutatott aneuszómiát, kizártuk a későbbi analízisekből. Az alkalmazott gyári FISH próbákat egészséges ember véreből nyert normál limfociták kromoszóma preparátumán teszteltük.

A FISH eredmények kiértékelése a 7q31-es régió kapott eredmények leírásánál ismertetett három módszerrel történt. Összesen 76 primer melanoma eltéréseit elemeztük FISH-el (45 nő és 31 férfi). A betegek átlagos életkora 60 ± 14 év volt (23-93 év). A betegek, primer tumor diagnózisát és műtéti eltávolítását követő átlagos túlélése $3,9 \pm 2,8$ év volt (0,04-12,6 év). Mind a 11-es kromoszóma, mind pedig a CCND1 sejtkenkénti kópiaszáma 0 és több mint 10 közé esett. A primer tumorok 66%-ában észleltünk 11-es kromoszóma aneuszómiát, míg a minták 83%-a mutatott valamilyen CCND1 kópiaszám alterációt. A 11-es kromoszóma CNI 1,3 és 4,9 közé, míg a CCND1 gén CNI 1,5 és 15,0 közé esett. A számított CCND1 CNI jól korrelált a 11-es kromoszóma kópiaszám eltéréseivel ($p=0,008$, Fisher egzakt teszt). A CCND1 gén FISH-el kimutatott jellegzetes kópiaszám eltéréseit a 10. ábrán foglaltuk össze.



10. ábra – CCND1 kópiaszám eloszlás interfázisos melanoma sejtekben. A 11-es kromoszóma centroméra specifikus próba SpectrumGreen jelölt (zöld szignál), míg a CCND1 gén specifikus próba SpectrumOrange jelölt (piros szignál). A sejtmagok DAPI-val festettek (kék szignál).

A.) CCND1 deléció, B.) CCND1 látszólagos amplifikáció, C.) CCND1 kismértékű amplifikáció és D.) CCND1 nagymértékű amplifikáció, klaszteres típusú

Az onkogén 11-es kromoszómához viszonyított extra kópiáját a vizsgált melanomás esetek 51%-ában figyeltük meg ($N=39$), míg a minták 32%-a ($N=24$) CCND1 delécióval volt jellemezhető. Nagymértékű amplifikációt 8 esetben (11%) detektáltunk. Egy minta kivételével, ahol a beteg elhalálása nem melanoma miatt következett be, ezek a melanomák agresszív fenotípusú, áttétképző és kifeléyesedő felszínű daganatok voltak.

IV./4B A primer melanomák klinikai-patológiai paraméterei és a CCND1 gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat elemzése

Hasonlóan a 7q31-es régió vizsgálatához, az elemzés során itt is, a már ismertetett AJCC által a rossz prognózis prediktoraiként definiált paraméterekre fókuszáltunk, kibővítve az

analízist az áttétképzés helyének, illetve a krónikus napsugárzás expozíciónak vizsgálatával. Az áttétképzés és túlélés elemzése során minimum 5 éves követési időt alkalmaztunk. A Kaplan-Meier túlélési görbék elkészítéséhez és a Cox regressziós analízishez két CCND1 kópiaszám kategóriát (amplifikált és nem amplifikált) képeztünk a kalkulált CNI alapján. A „cut-off” értéket ROC (receiver operating characteristic) görbe analízissel határoztuk meg, ahol a leoptimalisabb értéknek a 2,5 adódott. A Cox regressziós statisztika során korrekciót végeztünk a kedvezőtlen klinikai kimenetel ismert prediktoraira, mint az ulceráció, Breslow vastagság és metasztatizáló hajlam.

A CCND1 gén kópiaszám indexe szignifikánsan magasabb volt azokban a primer léziókban, melyek kifeléyesedő felszínnel rendelkeztek ($p=0,048$) és távoli szervi- illetve többszörös (lokális és távoli szervi áttétek is) metasztatizációkat ($p=0,029$) képeztek. Az onkogén kópiaszám eltérések és a klinikai-patológiai paraméterek közötti kapcsolat elemzés eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat – CCND1 kópiaszám eltérések és a primer melanomák klinikai-patológiai paramétereik közötti összefüggés

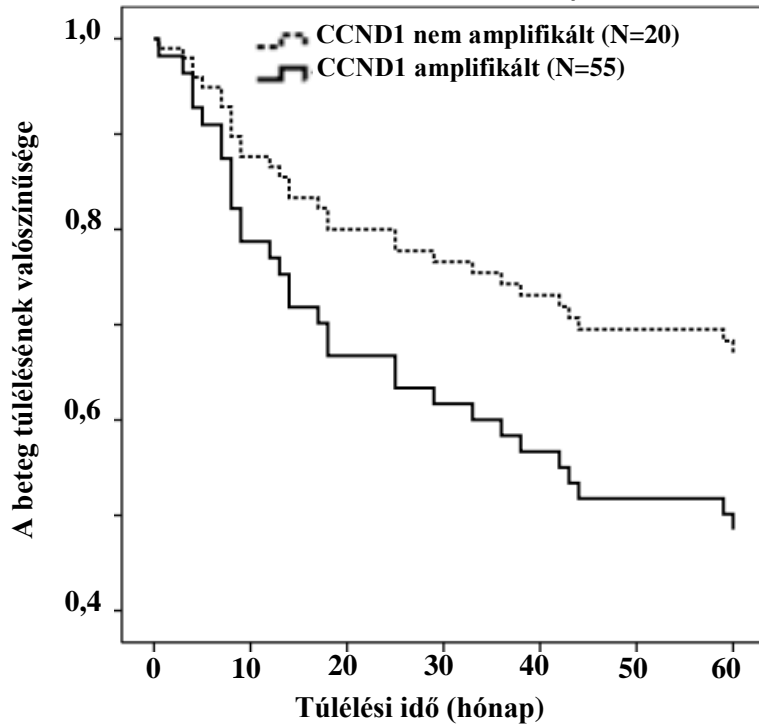
Paraméter	Mintaszám	Átlagos CCND1 kópiaszám index	$\pm SD^1$	p^2
Ulceráció				0,048
nem	39	2,4	0,4	
igen	37	4,2	3,5	
Áttétképzés				0,059
nem	35	2,5	0,8	
igen	40	3,7	3,1	
Áttétképzés helye				0,029
bőr/nyirokcsomó	13	2,7	1,1	
távoli szervi	16	3,8	3,5	
többszörös ³	11	5,0	3,8	
Breslow vastagság (mm)				0,277
$\leq 2,0$	30	4,1	2,8	
2,0 – 4,0	20	2,9	1,4	
$\geq 4,0$	26	4,2	3,8	
Szövettani altípus				0,304
SSM ⁴	48	4,2	3,3	
NM ⁵	28	3,5	3,1	
Beteg túlélése				0,160
életben van	43	3,7	2,5	
elhunyt	32	3,8	3,4	
Krónikus napsugárzásnak kitettség				0,191
nem	54	3,0	2,5	
igen	24	3,6	2,0	

¹standard deviáció; ²kétoldalú Mann-Whitney-Wilcoxon vagy Kruskal-Wallis teszt; ³bőr/nyirokcsomó és távoli áttétet is képzett; ⁴felszínesen terjedő melanoma; ⁵noduláris melanoma

Adataink normalizálást követően logisztikus regresszió segítségével is meghatároztuk a

Gyakori CCND1 amplifikáció jellemezte az ulcerált felszínű [esély hányados (EH) =2,9; 95% konfidencia intervallum (KI) =1,2–7,5; $p=0,024$] és többszörös áttétképző (EH=11,5; 95% KI=1,3–102,7; $p=0,028$) melanomákat. Tehát összességében a CCND1 gén többlete negatívan befolyásolhatja a melanoma progressziót.

A primer tumor felismerését és sebészi eltávolítását követő túlélési időt tekintve, a CCND1 amplifikált daganatok mintegy 1,6-szor nagyobb eséllyel okozták az egyén betegség specifikus halálát, habár ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,278$), valószínűleg a viszonylag kevés adatnak köszönhetően (11. ábra).



11. ábra – CCND1 kópiaszám alterációk és a beteg műtétet követő túlélési ideje közötti összefüggés. A CCND1 amplifikált (folyamatos vonal) és nem amplifikált (pontozott vonal) primer melanomák Kaplan-Neier túlélési görbéje. A Cox regressziós együttható 1,6 volt, $p=0,278$ szignifikancia értékkel. A két daganatcsoport közötti „cut-off” értéket (2,5) ROC analízissel határoztuk meg korrigálva az ulcerációra, metasztázis képzésre és Breslow vastagságra.

A BRAF és NRAS mutáció módosító hatása a CCND1 gén eltérések klinikai-patológiai paraméterekkel való összefüggéseire

Összesen 55 primer melanoma mintánál volt lehetőségünk vizsgálni a BRAF 600-as és NRAS 61-es aminosav pozíciójában kialakuló mutációk meglétét PCR-en alapuló olvadáspont analízis és direkt szekvenálás segítségével. Az analízisben résztvevő minták 44%-a ($N=24$) hordozott mutációt a BRAF 600-as kodonjában. Ezek közül 21 (88%) lézióban V600E, 2 (8%) tumorban V600K és 1 (4%) melanomában V600R mutációt tudtunk kimutatni. Míg az NRAS 61-es kodon mutációi összesen 8 (15%) primer melanomában voltak detektálhatók az alábbi típusokban: 5 (63%) Q61K, 2 (25%) Q61R és 1 (2%) Q61L mutációt hordozó lézió. A BRAF és NRAS mutációk egyetlen vizsgált mintában sem fordultak elő együttesen. A mutációt hordozó minták viszonylag alacsony száma és ugyanazon útvonalra gyakorolt azonos hatása miatt a különböző BRAF^{V600} és NRAS^{Q61} mutációkat együtt kezeltük az elemzések alkalmával.

A logisztikus regressziós analízis során korrigáltunk a BRAF és NRAS mutációs státuszra annak feltárására, hogy az onkogén eltéréseinek milyen, mutációtól független hatása van az általunk vizsgált klinikai-patológiai paraméterekre. A vizsgálat feltárta, hogy a CCND1 amplifikáció továbbra is összefüggésben áll a felszíni kifeléyesedéssel (EH=3,2; 95% KI=1,0–9,9; $p=0,045$) és a többszörös áttétképzéssel (EH=7,8; 95% KI=0,8–81,2; $p=0,085$). Azonban az utóbbi asszociáció nem bizonyult szignifikánsnak, feltehetőleg a széles

konfidencia intervallum vagy a viszonylag alacsony mintaszám miatt. Továbbá, a CCND1 amplifikációval rendelkező, de BRAF vagy NRAS mutációt nem hordozó primer melanomák 4,4-szer gyakrabban alakultak ki krónikus napsugárzásnak kitett bőrfelületeken (95% KI=1,2–16,5, $p=0,026$). Ezek az eredmények megerősítik azon korábbi elméleteket, miszerint a melanomák kialakulás legalább két molekuláris útvonalon történhet. Az egyik útvonal kulcselemét a CCND1 amplifikáció képezi, a MYC amplifikációval és 13q, 16q deléciókkal, míg a másik úton megjelennek a BRAF vagy NRAS onkogének mutációi, együttesen a CDKN2A és PTEN deléciókkal, így előfordulásuk különböző melanoma alcsoportozh köthető.

IV./4C CCND1 génexpressziós eltérések primer melanomákban és melanoma sejtvonalakban, kapcsolat a kópiaszám alterációkkal és BRAF/NRAS mutációs státusszal

A CCND1 gén mRNS expressziós változásai primer melanomákban, kapcsolata a BRAF és NRAS mRNS expressziós és mutációs státusszal

Vizsgálataink e szakaszában 28 friss-fagyasztott melanomából származó mintán határoztuk meg a CCND1 mRNS expresszió mértékét a kontroll nevus mintákhoz viszonyítva. Több mint 2-szeres mRNS szint csökkenést a léziók 39%-ában ($N=11$), míg expresszió fokozódást a vizsgált melanomák 18%-ában ($N=5$) mutattunk ki. A klinikai-patológiai paraméterekkel való összefüggések analízise rávilágított arra, hogy a CCND1 expressziós mintázat befolyásolhatja az áttétképzés helyét ($p=0,013$; Kruskal-Wallis egzakt teszt); jelentős csökkenést mutatva a többszörös áttétképző mintákban, ami ellentétes a kópiaszám eltéréseknél tapasztaltakkal. Ennek oka elsősorban az epigenetikai regulációban kereshető, ugyanis a CCND1 posztrankripciós lebontásáért felelős miR-193b mikro RNS mennyiségi fokozódása, csökkent CCND1 szintet eredményezhet függetlenül a gén kópiaszámtól.

A CCND1 mRNS szintváltozások ugyanakkor közepes mértékű pozitív korrelációt (Pearson korreláció) mutattak a BRAF ($B=0,553$, $p=0,002$) és NRAS ($B=0,678$, $p<0,001$) mRNS szintekkel, ami utalhat a RAS/MAPK útvonal melanomákra jellemző általános aktivitás fokozódására is. A CCND1 mRNS szint mértéke szignifikánsan összefüggött a BRAF és NRAS gének mutációs státuszával is ($p=0,009$, kétoldali egzakt Mann-Whitney-Wilcoxon teszt). A fenti mutációkat nem hordozó primer melanomák ugyanis megközelítőleg 2,3-szer nagyobb CCND1 expressziós szinttel rendelkeztek a mutációt hordozó mintákhoz viszonyítva, amit a kópiaszámnál már tárgyalt lehetséges molekuláris alcsoportok elmélete magyarázhat.

A CCND1 fehérje expressziós eltérései primer melanomákban és melanoma sejtvonalakban

Fehérje szinten összesen 54 primer melanomában vizsgáltuk a CCND1 kifejeződését szöveti microarrayk segítségével. A multiblokkok készítése és az ellenőrző lépések a 7q31-es régiónál leírtakkal azonos módon történtek. Az immunhisztokémiai eredmények kiértékelésénél alkalmaztuk a már korábban leírt, a protein festődés intenzitás mértékét figyelembe vevő 4 fokozatú skálát. Ezt kiegészítettük a quickscore módszerrel is, mely figyelembe veszi mind a festődés mértékét, mind pedig a pozitív sejtek százalékos arányát (4. táblázat). A mintákat 0-tól 2-ig terjedő csoportokba kategorizáltuk. Az additív quickscore módszerrel az alábbi csoportokat definiáltuk: 0, 1-3 pont; 1, 4-6 pont; és 2, 7-9 pont. A

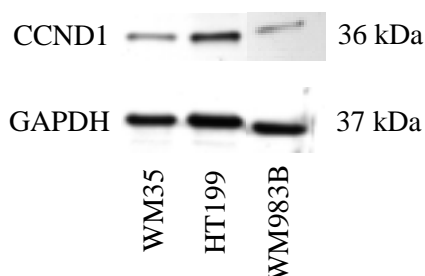
multiplikatív quickscore módszernél pedig az alábbi csoportokat alkottuk meg: 0, 0-6 pont; 1, 7-12 pont; és 3, 13-18 pont. Az additív quickscore az „A” kategória (festődést mutató sejtek százalékos aránya) és „B” kategória (festődés intenzitása) összege, míg a multiplikatív quickscore az „A” és „B” kategóriák szorzata adja meg. Mivel a különböző quickscore metodikák eredményei erős pozitív korrelációt mutattak ($R=0,996$, $p<0,0001$, Spearman korreláció), ezért a multiplikatív megközelítést alkalmaztuk a későbbi analízisekben, mivel az additív megközelítés elfedte a fehérjére negatív eredményeket, amit az esetek 13%-ában (7/54) megfigyeltünk, és a pontozási skála is szűkebbnek bizonyult. A vizsgált melanomák erős magi festődést és néhány esetben gyenge plazma pozitivitást is mutattak a fehérjére. A kiértékelés során csak a magi festődést tekintettük specifikusnak, így a melanoma minták 87%-a bizonyult pozitívnek.

4. táblázat – Quickscore kiértékelési módszer során alkalmazott pontozási skála

Festődő sejtek aránya szerint	Festődési intenzitás szerint
1 – 0% - 4%	0 – nincs festődés
2 – 5% - 19%	1 – gyenge festődés
3 – 20% - 39%	2 – közepes festődés
4 – 40% - 59%	3 – erős festődés
5 – 60% - 79%	
6 – 80% - 100%	

A CCND1 fehérje kifejeződés fokozódó mértéke szignifikánsan összefüggött a Breslow vastagsággal, áttétképzéssel és a betegek melanoma specifikus elhalálózásával (rendre $p=0,047$, $p=0,028$ és $p<0,001$; Fisher egzakt teszt).

Sejtvonal	IHC	GAPDH WB trace	CCND1 WB trace	CCND1/GAPDH
WM35	2+	1,410	0,143	0,101
HT199	3+	2,203	0,702	0,319
WM983B	1+	1,727	0,159	0,092



12. ábra - CCND1 protein expresszió különböző biológiai tulajdonságú humán melanoma sejtvonalakban. IHC: immunhisztokémia. A CCND1 fehérje festődés intenzitását az alábbiak szerint határoztuk meg: nincs festődés (0), gyenge (1+), közepes (2+) és erős (3+). WB trace: CCND1 protein szint a western blot eredmények denzitometriás kvantifikálást követően. A denzitás a membránon lévő fehérje sáv által elfoglalt terület (mm) egyes képpontjainak átlagos optikai denzitás értékein (OD) alapult.

Azonban a pozitív sejtek számát is figyelembe véve, a tumor vastagsággal való összefüggés eltűnt. Az eredmények tisztázására ezért 3, különböző biológiai tulajdonságú melanoma sejtvonalon (HT199, WM35 és WM983B) is végeztünk fehérje expressziós vizsgálatokat immunhisztokémia és western blot technikák segítségével. Erős CCND1 expresszió karakterizálta az agresszív tulajdonságú HT199-et. Ezzel szemben az invazív, nude egérben nem tumorképző WM35 sejtvonala viszonylag alacsony CCND1 fehérje expresszióval volt jellemezhető, de a legkevesebb CCND1 proteint a melanoma áttétből származtatott WM983B expresszálta. A western blot analízis eredményei megerősítették az immunhisztokémiai eredményeket (12. ábra).

Korábbi tanulmányok a CCND1 protein expresszió progresszív fokozódását írták le a malignus transzformáció során, ezzel ellentétben az előrehaladott tumorokra a fehérje szint csökkenése volt inkább karakterisztikus. A CCND1 expresszió szintjének ezt a fluktuációját leginkább a tumor sejt proliferáció és migráció közötti speciális kapcsolat eredményezheti. A nyugalmi (G₀/G₁ fázis) állapotban levő sejtek fokozott migrációs kapacitással rendelkeznek, szemben a proliferáló sejtekhez, mely utóbbi folyamatban a CCND1 molekulának központi szerepe van.

Vizsgálva az egyes molekuláris szintek közötti kapcsolatot, a CCND1 fehérje kifejeződésre nem volt szignifikáns hatással sem az mRNS szint, sem pedig az átlagos gén kópiaszám. Ennek egyik oka lehet a protein ROC1 fehérje által kontrollált degradáció deregulációja. Ugyanis a ROC1 expresszió melanomákban is megfigyelhető csökkenése emelkedett CCND1 szintet eredményezhet az mRNS expresszió fokozódása nélkül is.

V. A KUTATÁSI EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, A KUTATÁS TOVÁBBI LEHETSÉGES IRÁNYAI, AZ EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁNAK, HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

A malignus melanoma a legagresszívabb malignus daganatos elváltozás, melynek jelentős része rendkívül rossz prognózissal jellemezhető. Többségükben a MAP-kináz útvonal konstitutívan aktiválódik, melyet az NRAS vagy BRAF onkogének mutációja okoz a melanomák tumorigenezisének korai fázisában. Ezen mutációk végig fennmaradnak a daganat progresszió során, együttes előfordulásuk azonban ugyanabban a lézióban rendkívül ritka. Korábbi tanulmányok során már bizonyítást nyert, hogy a BRAF vagy NRAS mutációk egyedüli jelenléte nem elegendő a daganat kialakulásához.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy:

- A BRAF mutációt hordozó daganatokban a leggyakoribb eltérés az 1-es kromoszóma hosszú karjának (1q23-1q25), illetve a teljes 7-es kromoszómának a DNS-többlete és a 10-es kromoszóma hosszú karjának (10q213-10q26) hiánya. Az NRAS mutációt hordozó daganatokra a 11q22.3-11q25 régiót érintő delécia jellemző. Hierarchikus klaszter analízis alapján a 10-es kromoszóma hosszú karjának delécia szignifikánsan gyakrabban fordult elő a BRAF mutációt hordozó és előrehaladott stádiumú primer daganatokban.

- Korrelációs analízissel további kromoszóma lókuszeket azonosítottunk, amelyek genetikai eltérései nagy gyakorisággal, együttesen fordulnak elő a különböző genotípusú primer daganatokban.
- Eredményeink elemzése során, egy új adatbázis (Signalink) segítségével, a genetikai eltéréseket különböző jelátviteli útvonalakban szerepet játszó génekhez kapcsoltuk. A különböző jelátviteli útvonalak dinamikus kölcsönhatásainak részletes vizsgálatával felderítettük, hogy a BRAF mutációt hordozó daganatokban leggyakrabban a MAPK-JAK szignalizációs útvonalak közötti interakcióban résztvevő gének sérülnek.
- Random Forest analízis segítségével azonosítottuk a BRAF mutációhoz társuló gén kópiaszám eltéréseket a MAPK útvonalból.
- A 11q13 régió részletes vizsgálatát követően feltételezzük, hogy az ebben a régióban lokalizálódó kandidáns gének ko-amplifikációja, a BRAF vagy NRAS mutációval és a CCND1 emelkedett géndózisával társulva gyakrabban jellemző rossz prognózisú daganatokra, mint ezen genetikai eltérések jelenléte külön-külön.
- A 7q31 kópiaszám eltéréseinek primer melanomákban és áttétekben végzett FISH analízise szignifikáns összefüggést mutatott ki a kedvezőtlen klinikai kimenetellel.
- A 7q31-es lokuszon elhelyezkedő CAV1 és TES gének mRNS expressziós analízise csökkent CAV1 kifejeződést tárt fel vastag melanomákban, és a TES mRNS szint csökkenését a többszörös áttétképző primer mintákban; míg azok a léziók, melyek csupán kután vagy nyirokcsomó metasztázissal rendelkeztek, emelkedett TES mRNS szinttel jellemezhetők.
- A CAV1 fehérje szint szignifikánsan magasabb vékony primer tumorokban, míg a TES fehérje expresszió nem mutatott összefüggést egyetlen vizsgált paraméterrel sem.
- A 7q31 amplifikáció nem vagy csak gyenge korrelációban állt a CAV1 és TES gének mRNS és fehérje expressziós változásaival.
- A CCND1 gén kópiaszám eltéréseinek primer melanomákban szignifikáns összefüggést tárt fel a kedvezőtlen klinikai kimenetellel. Ezt az összefüggést befolyásolta a BRAF és NRAS gének mutációs státusza a napsugárzásnak való kitettség esetében.
- CCND1 mRNS szint csökkenés figyelhető meg azokban a primer tumorokban, melyek többszörös áttétképzéssel jellemezhetők; és a gén expresszió korrelációt mutat mind a BRAF és NRAS mRNS szintekkel, mind pedig ez utóbbi gének mutációs státuszával.
- A CCND1 protein fokozott expressziója áttétképzéssel és rövidebb túléléssel társul, valamint a fehérje szint összefüggést mutat a Breslow tumor vastagsággal is.
- az agresszív fenotípus kialakulásában a BRAF/NRAS onkogének aktivációs mutációi, együttesen a 11q13 lókuszon lokalizálódó gének eltéréseivel meghatározó szerepet játszanak
- eredményeink új specifikus terápiás célpontot szolgáltathatnak a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett

Összefoglalva: vizsgálataink célja volt a melanoma progresszióban szerepet játszó genetikai eltérések közül a 7q31-es régió és a 11q13 amplifikációs klaszter részletes elemzése, a kópiaszám eltérések és a BRAF-, illetve NRAS-mutációk közötti kapcsolat vizsgálata, jelátviteli útvonalakban betöltött genetikai eltérések felderítése és az eltérések klinikai-pathológiai paraméterekkel történő összehasonlítása. Megállapítottuk, hogy annak ellenére, hogy az NRAS és a BRAF onkogén aktivációs mutációi ugyanazon szignáltranszdukciós útvonalat aktiválják, a primer melanomák tumorigenezise során eltérő genetikai alterációkkal

kooperálnak. Ez a melanoma progresszió során tapasztalt jelenség rendkívül figyelemre méltó, hiszen arra utalhat, hogy a BRAF és NRAS mutációk egyfajta vezérlő erőként funkcionálnak az alternatív genetikai útvonalakat feltételező melanomagenesis során. Ezen eltérések megismerése új specifikus terápiás targetek azonosítására nyújt lehetőséget a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett. Megállapítottuk, hogy a 7q31-es lokusz és CCND1 gén amplifikációja prognosztikai jelentőséggel bír kútan melanomák kedvezőtlen klinikai kimenetelével kapcsolatban. Továbbá, az eredményeink szerint a CAV1, TES és CCND1 gének expressziós eltérései számos szempontból befolyásolhatják a tumor biológiai viselkedését.

VI. A ZÁRÓJELENTÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEINK, PHD ÉS TDK DOLGOZATOK (2009-2013)

Közlemények

1. Rakosy Z, Ecsedi S, Toth R, Vizkeleti L, Hernandez-Vargas H, Lazar V, Emri G, Szatmari I, Herceg Z, Adany R, Balazs M. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *PLOS ONE*. 2013;8(1):e54958. doi: 10.1371/journal.pone.0054958. Epub 2013 Jan 30. IF: 4,09*
2. Vizkeleti L, Ecsedi S, Rakosy Z, Orosz A, Lazar V, Emri G, Koroknai V, Kiss T, Adany R, Balazs M The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma *TUMOR BIOLOGY* 33:(6) pp. 2189-2199. (2012) IF: 2,143
3. Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Toth R, Orosz A, Szöllősi AG, Méhes G, Ádány R, Balázs M Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma *FRONTIERS IN BIOSCIENCE* E4: pp. 1802-1812. (2012)
4. Lázár V, Ecsedi Sz, Vízkeleti L, Rákosy Zs, Boross G, Szappanos B, Bégány Á, Emri G, Ádány R, Balázs M. Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization *MELANOMA RESEARCH* 22: pp. 202-214. (2012) IF: 2,187
5. Lázár V, Ecsedi S, Szöllősi A G, Tóth R, Vízkeleti L, Rákosy Z, Bégány A, Ádány R, Balázs M Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma *MODERN PATHOLOGY* 22: pp. 1367-1378. (2009) IF: 4,406
6. Balázs M, Ecsedi Sz, Vízkeleti L, Bégány Á Genomics of human malignant melanoma In: Yohei Tanaka (ed.) Breakthroughs in Melanoma Research. Rijeka: InTech, 2011. pp. 237-263. (**Melanoma/Book 1**) (ISBN:978-953-307-291-3) Chapter in Book/Study/Scientific
7. Balázs M Genomikai vizsgálómódszerek In: Ádány R, Sándor J, Brand A (ed.) Népegészségügyi genomika Budapest: **MEDICINA**, 2012. pp. 47-63. (ISBN:978 963 226 388 5) Chapter in Book/Scientific
8. Balázs M: Single-cell comparative genomic hybridization analysis of micronucleated cells. *CYTOMETRY PART A* 75:(7) pp. 557-559. Paper PMID: 19544322, 2009. IF: 3,259

9. Ecsedi Sz, Hernandez-VH, Lima CS, Herceg Z, Ádány R, Balázs M. Transposable hypomethylation is associated with metastatic capacity of primary melanomas **INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY** (revised version submitted: 2013. October) IF: 2.242 (mellékletben az Editor levele) IF: 2,242*

* 2012-es impakt faktorok

PhD dolgozatok

1. **Lázár Viktória Egészségtudományok Doktori Iskola** "Genetikai eltérések karakterizálása BRAF és NRAS mutációt hordozó humán primer melanomákban" 2013. május 30. témavezető Dr. Balázs Margit (<http://www.doktori.hu/index.php?menuid=193&vid=11144>)
2. **Vízkeleti Laura Egészségtudományok Doktori Iskola** „Biologic roles and prognostic relevances of gene alterations in human malignant melanomas” sikeres előzetes védés 2013. szeptember 16.-án. Eljárásra bocsátva, védés várható időpontja 2013. november eleje. (http://nepegeszseg.hu/edi2_elemei/vedese.htm)

TDK dolgozatok, OTDK szereplések

1. Pecérkeová Marianna Molekuláris biológia Msc II.évfolyam hallgató: 2011. „Melanoma xenograft és melanoma sejtvonalak genetikai eltérései: interfázisos FISH analízis”
2. Koroknai Viktória és Kiss Tímea, IV. molekuláris biológus hallgatók: Az EGFR és PTEN gének progresszióval összefüggő eltérései különböző grádusú astrocytoma daganatokban. TDK előadás 2010. Debrecen helyi TDK konferencia, TDK dolgozat
3. Kiss Tímea V. évf. molekuláris biológus hallgató: “Az oszteopontin (SPP1) expressziós eltérései malignus melanomában” TDK előadás, 2010. Debrecen helyi TDK konferencia, TDK dolgozat
4. Kiss Tímea és Koroknai Viktória IV. évf. molekuláris biológus MSc hallgatók: Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar: „Oszteopontin expressziós eltérései malignus melanomában”. TDK PÁLYAMUNKA és TDK ELŐADÁS (International Congress for Medical Students and Young Doctors Medicalis; Különdíj; 13-16 May 2010 Cluj-Napoca, Romania).
5. Koroknai Viktória és Kiss Tímea: EGFR and PTEN genes alterations in astrocytomas. 11th International Congress for Medical Students and Young Doctors 13-16 May 2010 Cluj-Napoca, Romania; I. helyezett előadás
6. Lukács Andrea II. évf. Biotechnológus MSc hallgató: Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar: „Melanoma sejtvonalak genom eltéréseinek jellemzése array komparatív genom hibridizációva” DE OEC helyi TDK ELŐADÁS, Különdíj.

7. Papp Orsolya és Lukács Andrea: Interfázisos fluoreszcencia in situ hibridizáció alkalmazása humán melanómák genetikai eltéréseinek karakterizálására XXXI. OTDK Szeged 2013. április 5-7. II. díj.

VII. A PÁLYÁZATI TÉMÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK AZ OTKA TÁMOGATÁS FELNTÜNTETÉSÉVEL

1. Ecsedi S, Tóth L, Balázs M Array CGH analysis of the rare laryngeal basaloid squamous cell carcinoma - a case report **INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY** 5:(8) pp. 834-839. (2012) IF: 2.242
2. Barok M, Balázs M, Lázár V, Rákosy Zs, Tóth E, Treszl A, Vereb G, Colbern G T, Park J W, Szöllősi J Characterization of a novel, trastuzumab resistant human breast cancer cell line **FRONTIERS IN BIOSCIENCE** 1:(2) pp. 627-640. (2010) IF: 4.048
3. Juhász A, Sziklai I, Rákosy Z, Ecsedi S, Ádány R, Balázs M: Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9 correlates with the bone destruction capacity of cholesteatomas **OTOLOGY & NEUROTOLOGY** 30:(4) pp. 559-565. (2009) IF:1.435
4. Ecsedi S, Rákosy Z, Vízkeleti L, Juhász A, Sziklai I, Adány R, Balázs M.: *Chromosomal imbalances are associated with increased proliferation and might contribute to bone destruction in cholesteatoma.* **OTOLARYNGOL HEAD AND NECK SURG** 2008 Nov;139(5):635-40., 2009 IF: 1.409

A fentiekén kívül eredményinket hazai és nemzetközi konferenciákon ismertettük.

Eddigi eredményeink számos olyan kérdést vetettek fel, melyekre a választ már újabb kutatási pályázatok támogatási keretein belül keressük. A jövőben elsődleges céljaink között szerepel az agresszív viselkedés hátterében szereplő molekuláris jelátviteli molekulák és azok interakcióinak megismerése.

Debrecen, 2013. október 28.

.....

Dr. Balázs Margit
egyetemi tanár, témavezető
DE OEC Népegészségügyi Kar
Megelőző Orvostani Intézet

Melléklet:

Dear Dr. Margit Balazs,

Your manuscript entitled “**Transposable hypomethylation is associated with metastatic capacity of primary melanomas**” has been received. The tracking number for this manuscript is **IJCEP_MS1309070**.

Preliminary review found that this is an interesting, very well-prepared manuscript; the data is interesting and convincing and is suitable for publication in IJCEP. Please consider your manuscript as "accepted" although we may contact you again for clarification, even revision if there are any questions during following further processing/reviewing.

Otherwise, you may receive the PDF of your paper for proofreading directly 1-2 weeks before publication along with the official editorial decision. Please check the following link for the status update of your paper:

<http://www.ijcep.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/633/>

At the same time, please **change the font of the text in all figures to Arial** as required by IJCEP and send the figures to us **before October 10, 2013**. Other minor revisions will be performed by our editorial staff directly for the efficiency.

Thank you for publishing your nice paper with us. We look forward to receiving more great manuscripts from you in the future:

www.e-century.org

Editorial Office

International Journal of Clinical and Experimental Pathology

<http://www.ijcep.com/>