

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN MALIGNUS MELANOMA PROGRESSZIÓJÁVAL
TÁRSULÓ GENETIKAI ELTÉRÉSEK ANALÍZISE
IN SITU HIBRIDIZÁCIÓS MÓDSZEREKKEL**

ÁDÁM ZSUZSANNA

Témavezető: Dr. Balázs Margit

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET**

DEBRECEN, 2001

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A melanoma epidemiológiája	5
2.2. A melanoma patológiája	5
2.3. A malignus melanomában előforduló molekuláris eltérések	6
3. Célkitűzések	11
4. Anyagok és módszerek	12
4.1. Kísérleti melanoma metasztázis modell	12
4.2. Sejtvonalak	12
4.3. Sejttenyésztés	13
4.4. Tumorok	13
4.5. Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)	13
4.5.1. CGH-hibridizáció	13
4.5.2. Digitális képalkotás	14
4.6. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)	15
4.6.1. DNS próbák eredete, jelzése és detektálása	15
4.6.2. FISH-hibridizáció	16
4.6.3. Fluoreszcens mikroszkópia	16
4.7. FCM	17
4.8. Immunhisztokémia	17
4.9. Statisztikai analízis	17
5. Eredmények	18
5.1. FISH és CGH módszerek adaptálása, melanoma sejtvonalak genetikai eltéréseinek analízise, a genetikai eltérések összehasonlítása	18
5.2. Kromoszóma veszteség szerepe a humán malignus melanoma progressziójában és a metasztázisképzésben	21
5.3. Kromoszóma instabilitás vizsgálata primer és metasztatikus melanomán CGH módszerrel	23

5.3.1. Primer melanomában CGH-val kimutatott genetikai elváltozások	24
5.3.2. Melanoma metasztázisokban CGH-val kimutatott genetikai elváltozások	27
5.3.3. Ugyanazon betegből származó primer melanoma és metasztázisának összehasonlító elemzése	29
5.3.4. A kromoszóma elváltozások és kliniko-patológiai paraméterek összehasonlítása primer melanomákban	30
5.4. Melanoma metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai eltérések azonosítása	31
5.5. A máj-metasztatizáló képesség és a kromoszómális eltérések tanulmányozása CGH és FISH módszerekkel	33
 6. Megbeszélés	37
6.1. Melanoma sejtvonalak összehasonlítása molekuláris genetikai módszerekkel	37
6.2. Kromoszóma vesztés szerepe a humán malignus melanoma progressziójában és a metasztázisképzésben	39
6.3. Kromoszóma instabilitás vizsgálata primer és metasztatikus melanomán CGH módszerrel	40
6.4. Melanoma metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai marker azonosítása	43
6.5. A máj-metasztatizáló képesség kapcsolatban áll a 4, 9p21-pter és 10p kromoszóma vesztéssel	45
 7. Összefoglalás	48
 8. Rövidítések jegyzéke	50
 9. Irodalomjegyzék	51
 10. Közlemények jegyzéke	58
10.1. A tézishoz felhasznált közlemények	58
10.2. A tézishoz kapcsolódó előadások és posztterek	58
10.3. Egyéb közlemények	58

1. BEVEZETÉS

A bőr daganatos megbetegedései közül az epidermis melanocitáinak kóros burjánzásából származó melanoma a legmalignusabb elváltozás. Az utóbbi négy évtizedben gyakorisága, a nők tüdődaganatának kivételével, világszerte, beleértve hazánkat is, minden más malignus betegségénél gyorsabban emelkedett. Kialakulásának leglényegesebb rizikótényezője az intenzív, ismételt ultraibolya sugárzás, de a veszélyeztetettséghez más paraméterek is hozzájárulnak (pl. a bőr típusa, kémiai karcinogénnel történő expozíció, genetikai predispozíció, a DNS-javítás kapacitását befolyásoló genetikai faktorok). Agresszív viselkedésére jellemző, hogy már a tumor korai stádiumában áttét képzésére hajlamos, nemcsak a környező bőrbe és a regionális nyirokcsomókba, hanem távoli szövetekbe, szervekbe is. A távoli metasztázisok megjelenése rossz prognózist jelent, a betegek hosszú távú túlélési esélye nagyon lecsökken.

Molekuláris biológiai és citogenetikai tanulmányok eredményei igazolták, hogy a genetikai elváltozások lépcsőzetes megjelenése a normális sejtnövekedés és a sejthalál szabályozásának megváltoztatásával hozzájárul a carcinogenezis folyamatához. Bebizonyosodott, hogy specifikus genetikai elváltozások jelenléte a terápia megválasztásában alapvető jelentőségű lehet. Ennek tudatában melanomában a metasztatikus progresszió molekuláris mechanizmusának megértése rendkívüli jelentőséggel bír, fontossága nem hangsúlyozható eléggé, hiszen a metasztatikus szubklónok primer tumorokban való jelenlétének kimutatásával a betegség lefolyását előre tudjuk jelezni. Ez új, a tumorok genetikai eltéréseit is magába foglaló, osztályozási rendszer kialakítását eredményezheti, illetve genetikai kockázatbecslést tesz lehetővé.

A melanoma metasztatikus szóródásához vezető genetikai eltérésekről jelenleg nem bírunk elegendő ismerettel, nem áll rendelkezésünkre a betegség patológiai jellemzőihez, a tumor kialakulásának és progressziójának egyes lépéseire társuló genetikai változások részletes leírása annak ellenére, hogy a metasztázis kialakulása a beteg túlélését meghatározó legfontosabb faktor. Az irodalomban megjelent nagyszámú tanulmány eredményei ellenére, a melanomára jellemző nagy mértékű genetikai heterogenitás kizárja, hogy egyszerű modell segítségével a metasztatikus viselkedés hátterében álló genetikai történésekre magyarázatot találjunk.

A klasszikus citogenetika kromoszómasávozáson alapuló módszere a tumorban előforduló genetikai eltérésekről csak korlátozott információt szolgáltatott, ami elsősorban az *in vitro* sejtenyésztés technikai nehézségeivel hozható kapcsolatba. A 80-as évek végét követően egyre jelentősebbé váltak azok a molekuláris genetikai metodikák, melyek

segítségével a kromoszómális szintű genetikai eltérések megismerése a tumor sejtek *in vitro* tenyésztése nélkül is megvalósítható. Kiemelkedő jelentőségű ezek közül a technikák közül a fluoreszcencia in situ (FISH) és komparatív genomális hibridizáció (CGH). A CGH előnye a tumorok teljes genomra kiterjedő gyors és átfogó genetikai analízisében ma már vitathatatlan, hiszen ezzel a módszerrel felismert genetikai elváltozások azokra a kromoszómális régiókra mutatnak rá, melyek specifikusak lehetnek egy adott daganat típusra, továbbá a tumor progresszió meghatározott stádiumára. Ezen specifikus kromoszóma szakaszok részletesebb analízise szükséges ahhoz, hogy az adott régióban elhelyezkedő géneket, melyek sokszor eddig ismeretlen onkogének vagy tumor szuppresszor gének lehetnek, felismerjük.

Melanomára vonatkozóan ez idáig mindössze három olyan közlemény jelent meg, ahol a szerzők ezt a molekuláris genetikai módszert alkalmazták. Mindhárom tanulmányban csak primer tumorok tanulmányozására került sor, a metasztázisokban detektálható eltérésekről és az esetleges különbségekről így nem állt rendelkezésre információ. A melanoma kialakulásához és progressziójához társuló genetikai eltérések feltérképezése és ezen eltérések, valamint a daganat agresszív metasztázisképző tulajdonsága közti klinikailag releváns összefüggések vizsgálata tehát alapvetően fontos a melanoma kutatásában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Epidemiológia

Az utóbbi négy évtizedben a bőr melanomájának gyakorisága, a nők tüdőtumorának kivételével, világszerte minden más malignus betegségnél gyorsabban nő (1). Hazai viszonylatban is a malignus melanoma (MM) az egyik leggyakrabban előforduló tumor, a tumor jelenlegi előfordulási gyakorisága 9.2/100000 lakos szinten van. Szöveti típus szerint hazánkban leggyakoribb az SSM és ezt követi a noduláris MM, amely a legrosszabb prognózisú a melanomák közül. A hazai vizsgálatok szerint az észlelt esetek között gyakoriságban a Clark III. és IV. stádium vezet, ez eredményezi a viszonylag nagymértékű elhalálozást (2).

Jelenleg a primer tumoroknál a prognózis osztályozásának alapját a tumor hisztopathológiai paraméterei, a Breslow tumor vastagság és az invázió Clark szintje képezik. Ha azonban a betegnél már kialakult a regionális metasztázis, a primer tumor hisztopatológiai képe tovább nem járul hozzá szignifikánsan a túlélés előrejelzéséhez (3). Ebben a tumor fázisban a nyirokcsomó metasztázis kiterjedése a fő prognosztikus tényező. A betegek azon részében, akinél a tumor vastagsága kisebb, mint 1.5 mm, kb. 25-30% (vagy még e fölötti) azoknak a betegeknek az aránya, akiknél a tumor mikrometasztázissal bír a regionális nyirokcsomóban. Mivel a távoli metasztázis kisebb esélyét figyelembe véve a betegek nyirokcsomó-negatív csoportja kevésbé toxikus terápiát kap, ez a populáció általában összemósodik a betegek azon 70-75%-ával, akiknek kiváló a prognózisa, elrejtve így az adjuváns kezelés potenciális hasznát (4).

2.2. Patológia

A bőr daganatos megbetegedései közül az epidermis neuroektodermális eredetű melanocitáinak kóros burjánzásából származó melanoma a legmalignusabb elváltozás. A tumor általában de novo keletkezik, de már meglévő premalignus elváltozás, nevus talaján is kialakulhat annak kóros irányba történő fejlődésével. A malignus melanoma megjelenése idősebb korban (30-60 év) gyakoribb, pubertás előtt rendkívül ritkán alakul ki.

Szövettanilag a tumor a dermoepidermalis junctio területén keletkezik, ahol irreguláris aktivitás figyelhető meg, atipikus és malignus nevus sejtek vándorolnak a bőrben lefelé a dermis irányába (ilyen "lecsepegés", junctionalis aktivitás a gyermekkorban rendszeresen előforduló jelenség, ami pubertás körül befejeződik, és későbbi jelenléte már premalignus

elváltozásnak tekintendő). A melanoma tumor sejtek mérete és alakja változó, jellemző a mitózisban lévő sejtek emelkedett száma (5).

Kliniko-patológiai szempontból a melanoma alábbi négy típusát különböztetjük meg: superficialis malignus melanoma (SSM), nodularis malignus melanoma (NMM), lentigo maligna melanoma (LMM) és acralis lentigo melanoma (ALM). A melanoma kialakulásának és progressziójának öt lépése van: nevus; diszpláziás nevus; radiális növekedési fázis (RGP); vertikális növekedési fázis (VGP) és metasztázis. A melanoma prognózisát befolyásoló klinikai és hisztopatológiai faktorok közé tartozik a tumor anatómiai lokalizációja, vastagsága (Breslow vastagság), az invázió szintje (Clark klasszifikáció), a mitotikus index, tumort infiltráló limfociták, kifekélyesedés, vérzés és a metasztázisok jelenléte. Ezek közül elsődleges fontosságúak a Breslow vastagság, a Clark szint és a metasztázis jelenléte (6, 7). Clark osztályozása alapján az invázió 5 szintjét különböztetik el aszerint, hogy a tumor sejtek I. csak az epidermisben vannak jelen (in situ melanoma, nem invazív), II. a papillaris dermisben is megjelennek, III. kitöltik a papillaris dermist (de nem penetrál a reticularis dermisbe), IV. infiltrálják a reticularis dermist (de nincs invázió a subcutan szövetbe) és V. behatolnak subcutan szöveti rétegbe.

A legtöbb malignus melanoma már korai stádiumban is hajlamos a metasztázis képzésre, a metasztázisok elsősorban a környező bőrben és a regionális nyirokcsomókban jelennek meg. A progresszió későbbi szakaszában hematogén úton terjed szét a testben. Májban a melanoma metasztázisok száma igen nagy lehet. Egyes kutatók szerint ha kifejlődik távoli metasztázis, a melanoma hisztopatológiai jellemzői már nem segítenek a túlélés előrejelzésében, és a betegség pár éven belül végzetes (3, 8). Az SSM és az LMM általában jobb prognózist mutat mint a nodularis típus, az invázió mélységét tekintve pedig az első három szint rendelkezik a legjobb prognózissal (5, 8). Általánosan elfogadott nézet, hogy a 0.75 mm-nél vékonyabb tumorok (Breslow vastagság) prognózisa jó, a metasztázisok kialakulása viszonylag ritka (6). A melanoma kezelésében továbbra is a lézió idejekorán történő sebészi eltávolítása foglalja el a fő helyet.

2.3. Molekuláris eltérések malignus melanomában

Az eukarióta sejtek DNS készlete az állandó károsodások miatt folyamatos javításnak és reszintézisnek van kitéve. A genom kiterjedt DNS károsodásai ellenére a homeosztatikus ekvilibrum fenntartására több DNS javítási útvonal van, s így normál sejtekben a legtöbb DNS károsodás hiba nélkül kijavításra kerül. A tumorsejtekben azonban az egyensúly

megbomlik, a genetikai károsodások nem lesznek kijavítva és a genomban mutációk halmozódnak fel. A halmozódó mutációk képezik a tumor kialakulásának alapját, és meghatározzák további fejlődésének útvonalát. Egyre inkább elfogadott nézet, hogy a tumoros sejtek instabil genommal rendelkeznek, és az instabilitás eredményezi azt a mutációs kaszkádot, mely képessé teszi a tumorsejteket arra, hogy kikerüljenek a normális szabályozás alól. A genetikai instabilitás a tumoros sejtek nagyfokú heterogenitásában manifesztálódik egyrészt nukleotid szinten, másrészt kromoszómális szinten, transzlokációk, deléciók, amplifikációk és aneuploidia formájában. A nukleotid szintű és kromoszómális elváltozások megváltozott protein expressziót/funkciót és géndózishoz kötött eltéréseket eredményeznek.

Az egyik leggyakrabban megfigyelt jelenség a humán tumorokban az aneuploidia, azaz a kromoszómaszámban bekövetkező változás. A kromoszómák számbeli változása általában arányban áll az adott tumor malignus potenciáljával, ami azt jelenti, hogy a mutációk egyre több genetikai eltéréshez vezetnek a carcinogenezis során (9, 10). Aneuploidia keletkezhet kromoszóma töredezés, transzlokáció, amplifikáció vagy non-diszjunkció eredményeként, és lehet korai, vagy akár iniciális esemény a genetikai instabilitás kialakulásában. Tekintve, hogy egyetlen kromoszómán számtalan gén helyezkedik el, a kisebb kromoszóma szegmentumokat érintő DNS újrendeződések, deléciók, inszerciók, transzlokációk jelentős része a megfigyelési módszerek korlátai miatt rejtve marad. Elképzelhető, hogy az aneuploidia progresszív fokozódása a genetikai instabilitás fő kialakulási útvonalát reprezentálja, és más típusú mutációktól független jelenség.

Általános nézet, hogy a strukturális kromoszómális elváltozások illetve teljes kromoszóma veszteségek a tumor fejlődés korai fázisában fellépnek, és a daganat egy átmeneti hipodiploid állapotba kerül. Ezután a DNS tartalom megduplázódik, ami elméletileg megmagyarázza a leggyakrabban megfigyelt hipotetraploid képet. Egy másik verzió szerint a DNS tartalom megduplázódása következik be hamarabb, majd ezt követően sorozatos kromoszóma eltérések biztosítanak növekedési előnyt a tumoros sejteknek. Ezekre az elméletekre azonban kevés direkt kísérleti bizonyíték van. Tumorokban genetikailag leggyakoribb a tumorsejtek hipotetraploid állapota, ami azt jelenti, hogy a tumor egyrészt tetraploidizálódik, másrészt deléciót szenved bizonyos kromoszómákon (11, 12). Hipodiploid emlőrákos minták vizsgálata során kimutatták, hogy a strukturális eltérések (DNS nyelés/vesztés) korábban bekövetkeznek, még az aneuploidizáció előtt. Valószínűleg mindkét eltérés nagyon korán kialakul, mivel preinvaszív emlőrák már többnyire aneuploid (13). Ennek ellenére nem tisztázott még, milyen sorrendben következnek egymás után az eltérések, vajon előbb tetraploidizálódik a tumor és utána jönnek a deléciók, vagy fordítva.

A genetikailag heterogén primer tumorban – kezdetben valószínűleg random módon – keletkező mutációk és ezzel együtt a különböző génállománnyal rendelkező sejtklónok száma folyamatosan nő. A tumoros masszában a rengeteg genetikailag különböző sejtpopuláció közül az erős szelekciós nyomás hatására nagyon korán kiválasztódik és leválik az idegen környezetben is túlélni képes metasztatikus sejtklón, vagy sejtklónok; ezek lokálisan a bőrben, vagy távolabb a nyirokcsomókban, esetleg távoli szervekben megtapadva nőnek tovább (14, 15, 16). Számos tumornál megfigyelték specifikus, az adott szövettípusra és tumortípusra jellemző nem-random genetikai eltérések megjelenését, melyek a tumor fennmaradásnak biztosításában játszanak szerepet – colon karcinómánál ismert a tumor progresszió során a genetikai eltérések megjelenésének nem-random láncolata (17, 18).

A tumorok többségében, köztük melanomában, még nem áll rendelkezésünkre a betegség patológiai jellemzőihez, a tumor kialakulásának és progressziójának egyes lépéseire társuló genetikai változások részletes leírása (19). Malignus melanomában a klasszikus citogenetikai tanulmányok a kromoszómális elváltozások egész sorát derítették fel, melyek elsősorban a kromoszómák strukturális és számbeli eltéréseinek formájában jelentkeznek. Ezek az elváltozások a leírások alapján leggyakrabban az 1-es, 6-os, 7-es, 8-as, 9-es és 10-es kromoszómát érintik (20, 21). Annak ellenére, hogy az említett kromoszómák elváltozásait viszonylag korán leírták, a melanomára jellemző nagy mértékű genetikai heterogenitás kizárja, hogy egyszerű modell segítségével a metasztatikus viselkedés hátterében álló genetikai történésekre magyarázatot találjunk. Következik ez abból is, hogy jelen tudásunk szerint a melanoma kialakulásának több alternatív útvonala is lehet (22, 23). Ráadásul a jelenlegi modellek a primer és metasztatikus melanomát külön-külön vizsgáló kereszttetszeti tanulmányokra és melanoma sejtvonalakból származó következtetésekre épülnek, így nem egyértelmű ezek kiterjeszthetősége az emberben in vivo bekövetkező változásokra (24, 25).

Az említett kromoszómák strukturális és számbeli változásai közül a 9-es kromoszóma elvesztését a melanoma korai fázisával hozzák kapcsolatba, elsősorban azért, mert gyakori a 0.75 mm-nél kisebb tumorokban – sokszor már az RGP fázisban is kimutatható – illetve bizonyos eltérések csak a 9-es kromoszóma teljes vagy részleges deléciója esetén jelentkeznek. A melanoma korai stádiumában bekövetkező 9p kromoszómakar-vesztést és a 9p21-p22 régióban elhelyezkedő CDKN2/p16INK4 tumor szuppresszor gén delécióját kapcsolt elváltozásnak tartják. Úgy vélik, a melanoma kialakulásának korai szakaszában talán ennek a génnek a károsodása a legfontosabb faktor (26). LOH tanulmányok alapján felmerült az is, hogy a CDKN2/p16INK4, mint tumor szuppresszor gén, sporadikus melanomában a progresszió során a késői fázisban játszik szerepet (27, 28).

A 10-es kromoszóma delécióját, ami ugyancsak gyakori kromoszómális elváltozás, a 9-es kromoszómához hasonlóan szintén korai eltérésnek tekintik. Leggyakrabban a 10-es kromoszóma hosszú karjának elvesztését mutatták ki, ahol a 10q24-qter régió transzlokációját és a heterozigotáság elvesztését is megfigyelték. A 10q23.3 lókuszon elhelyezkedő PTEN/MMAC1 gén deléciója a jelenlegi elképzelések szerint szerepet játszik a melanoma progressziójában (26, 29, 30).

A kromoszómavesztések közül ezek mellett kiemelendő a 6-os kromoszóma hosszú karjának deléciója. Ezt a változást a progresszió későbbi fázisával hozzák kapcsolatba, és úgy tűnik, összefüggésben áll a rosszabb klinikai lefolyással. Ez magyarázható azzal, hogy a 6q kromoszóma-szakaszon több olyan tumor szuppresszor gént is feltételeznek, ami a melanoma patogenezisében érintett lehet. Ezek közé tartozik az AIM1 a 6q21 régióban (31). Ugyanezen kromoszóma rövid karjára ellenben DNS többlet megjelenése jellemző, ami onkogén jelenlétére, vagy ha a rövid és hosszú kar elváltozása egyszerre jelentkezik, esetleg izokromoszómális átrendeződésre utalhat (32).

A 7-es kromoszómán talált eltérések sokkal összetettebbek, ami számos DNS lókusz érintettségét foglalja magába. A 7p kar amplifikációja gyakori eltérés, ami többek között a 7p12-13 régióra lokalizált EGFR gén fokozott expressziójával hozható kapcsolatba (33, 34). A 7-es kromoszóma gyakori aneuploidiaja is utal erre. A kromoszóma elváltozását a vastagabb tumorokban történő gyakoribb megjelenése és más kromoszómális eltérésekhez való kötődése alapján a progresszió későbbi fázisára teszik (33, 34).

A 8-as kromoszóma alterációját számos rákban megfigyelték, és azt találták, hogy a 8-as kromoszóma triszómiája rossz prognózissal társul (35). Melanoma vonatkozásában ezek az adatok hiányosak, a CGH-val is leírt 8q amplifikációt csak mostanában hozzák kapcsolatba a C-MYC onkogén amplifikációval. A C-MYC expresszió fokozódását RT-PCR-ral és immunhisztokémiai módszerrel is kimutatták késői melanomában (36). Több munkacsoport a C-MYC mellett más, a 8q-karon lokalizálódó, onkogén szerepére is utal (36, 37).

Melanomában az 1-es kromoszóma rövid karján részleges vagy teljes deléciót figyeltek meg. Poetsch és munkatársai szerint ez a kromoszómális eltérés fokozott metasztatizáló hajlammal társul. Az LOH és FISH adatok alapján az 1p31-1p36 DNS lókuszon a melanoma progresszióval társuló – feltehetően tumor szuppresszor – gén lokalizálódik (38, 39).

Mindenképpen említésre méltó, a lényegesen ritkábban megjelenő eltérések közül a 20-as kromoszóma többlete. Ezt az eltérést melanoma sejtvonalakban, primer melanomákban és számos más humán tumorban megtalálták, és ezek alapján feltételezik, hogy a kromoszóma q karján – 20q13 – fontos onkogén helyezkedik el (40). A 17-es kromoszómát érintő

elváltozások citogenetikai tanulmányok szerint többnyire deléciók, de primer tumorok CGH vizsgálata során DNS többlet ugyancsak kimutatható ezen a kromoszómán (20, 41).

Az irodalomban nagyszámú tanulmány jelent meg azokról a genetikai eltérésekről, amelyek a melanoma metasztatikus szóródáshoz vezetnek, de még mindig keveset tudunk a folyamatról, annak ellenére, hogy a metasztázis a legfontosabb faktor, ami meghatározza a beteg túlélését. A metasztatikus progresszió molekuláris mechanizmusának megértése rendkívüli jelentőséggel bír, fontossága nem hangsúlyozható eléggé, mert akár forradalmasíthatja a terápiát, mivel a metasztatikus szubklónok primer tumorokban való jelenlétének kimutatásával a betegség lefolyását előre tudjuk jelezni.

Ahogy korábban is említettük, a progressziót kutató vizsgálatok többsége in vitro tenyésztett melanoma sejteken történt, ezért az in vivo lezajló primer és szekunder genetikai elváltozásokat ez alapján meglehetősen nehéz megítélni (megjegyzendő, hogy a modellként használt sejtvonalaknak van egy igen komoly előnye, hogy ti. nagyon jól karakterizáltak, így az eltérések felismerése és követése sokkal egyszerűbb). A molekuláris módszerek fejlődése azonban lehetővé teszi, hogy az agresszív viselkedés hátterében álló genetikai változásokat a tumor sejtek in vitro manipulálása nélkül vizsgáljuk. Különös jelentőséggel bír ezek közül a technikák közül a CGH, mely mind az ismert, mind az ismeretlen kromoszómális eltérések kimutatására igen hatékony módszernek bizonyult (42, 43). A CGH módszer előnye, hogy egyetlen kísérlet során képes a teljes genomot átfogó kromoszómális alterációk relatív számáról információt adni. Közel diploid vagy aneuploid háttérrel rendelkező sejtekben a CGH a legalkalmasabb módszer a nagy gyakorisággal bekövetkező kromoszóma eltérések, illetve a sejtpopulációkban jelenlévő domináns eltérések kimutatására. A CGH módszer kiegészítésére jól alkalmazható a FISH módszer, melynek segítségével képesek vagyunk adott lokuszok előfordulásának abszolút számát meghatározni egyedi sejtek szintjén, továbbá alkalmazásával a csak alacsony sejtszámmal jellemezhető kis szubklónok kromoszómális alterációit is ki lehet mutatni (44).

Melanomára vonatkozóan mindössze három olyan közlemény jelent meg, ahol a szerzők a CGH módszert alkalmazták (41, 45, 46). Mindhárom tanulmányban csak primer tumorok tanulmányozására került sor, a metasztázisokban detektálható eltérésekről és az esetleges különbségekről így nem állt rendelkezésre információ.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám során vizsgálni kívántam Magyarországon a molekuláris diagnosztika legújabb vonalát képviselő CGH és FISH módszereket külön-külön, illetve kombinált alkalmazhatóságukat, előnyeiket melanoma sejtvonalakon, amihez természetesen hozzátartozott a két módszer adaptálása és validitásának biztosítása.
2. Az irodalomban ritka hipodiploid kromoszóma készlettel rendelkező tumoros esetek genetikai adatállományának bővítésére egy hipodiploid melanoma primer tumorban és metasztázis párjában FISH módszer segítségével kívántam karakterizálni a megjelenő genetikai aberrációkat, amelyből a tumor iniciáció és progresszió genetikai eseményeire következtethetünk.
3. Munkám során célom volt a malignus melanomában megfigyelhető genetikai heterogenitás és klonális fejlődés kimutatása és elemzése, a progresszió során fellépő genetikai eltérések, kromoszómális deléciók és amplifikációk részletes leírása primer melanoma tumorok, melanoma metasztázisok és ugyanabból a betegből származó primer és metasztatikus léziók esetén CGH módszer segítségével.
4. A malignus melanoma egyik veszélye a korai áttétképzés, s progressziójának előrejelzése igen nehéz feladat. Hogy időben meg tudjuk mondani, ki az, akinél ez a veszély fennáll, CGH-val azonosítani kívántam a metasztatikus szóródásra hajlamosító vagy azzal kapcsolatba hozható genetikai elváltozásokat. Olyan genetikai markereket kerestem, amelyek segítségével a melanoma prognózisa korábban megjósolható, és időben megfelelő terápia mellett dönthet a beteg kezelőorvosa.
5. A távoli szervekben létrejövő áttét tehető felelőssé a melanoma halálozás nagy részéért. Tanulmányomban sejtvonal modellen vizsgáltam a melanoma máj-metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai eltéréseket.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Humán melanoma szövetminták

A primer melanoma tumorok és metasztázisok FISH és CGH vizsgálatához felhasznált friss szövetminták a DE OEC Bőrgyógyászati Klinikájának műtéti anyagából származtak. Munkám során összesen 41 tumoros humán szövetmintát vizsgáltam. A szövetmintákat OCT-be ágyazva –86 C°-on tároltuk. A diagnózis hematoxin-eozin festéssel végzett szövettani vizsgálat alapján történt. A CGH analízishez csak azokat a daganatokat dolgoztuk fel, melyek tumorsejt tartalma meghaladta a 70%-ot. A mintákból a genomiális DNS preparálása standard módszerrel történt (47).

4.2. Melanoma sejtvonalak

Kísérleteink során az alábbi hat, különböző metasztázis képző hajlammal rendelkező melanoma sejtvonalat vizsgáltuk. A sejtvonalak karakterizálását Dr. Tímár József és Dr. Ladányi Andrea végezte el (Országos Onkológiai Intézet, Budapest).

- A2058 – egy 43 éves beteg agyi metasztázisából származó humán amelanotikus melanoma sejtvonal (48).
- HT168 – az A2058 xenograftként való in vivo adaptációjával kialakított HT168 tumorból kialakított sejtvonal (49).
- HT168-M1 – a HT168 sejtek immunszuppresszált egér lépébe ültetésével létrehozott sejtvonal (50).
- WM35 – benignus, nude egérben nem-tumorkeltő, korai (RGP) fázisú humán melanoma sejtvonal (51).
- M24 – nyirokcsomó metasztázisból izolált, nude egérben tumorkeltő humán melanoma sejtvonal (52).
- M24met – az M24 sejtek által nude egér nyirokcsomójában létrehozott metasztázisból kialakított agresszív viselkedésű sejtvonal (53).

4.3. Kísérleti melanoma máj-metasztázis modell

Az előzőekben ismertetett sejtvonalak közül három (A2058, HT168, HT168-M1) jellegzetessége, hogy egymással szoros kapcsolatban állnak. Az A2058 szülői sejtvonal xenograftként történő in vivo adaptációja vezetett a HT168 tumor, illetve abból a HT168 sejtvonal kialakításához, majd a HT168 sejtek immunszuppresszált egér lépébe ültetése eredményezte az agresszív metasztatizáló hajlammal rendelkező HT168-M1 sejtvonalat. A HT168-M1 sejtek máj-kolonizáló képessége extrém magas, immunszuppresszált egér lépébe injektálva több mint 250 metasztázist hozott létre (50). Ezzel ellentétben, az eredeti A2058 és az ebből származtatott HT168 sejtvonal ugyanazon kísérleti körülmények között nem, vagy csak kevés máj-metasztázist adott. A HT168-M1 megnövekedett máj-kolonizáló képessége nem járt együtt a sejtek in vivo vagy in vitro proliferatív kapacitásának fokozódásával (50).

4.4. Sejttenyésztés

A fenti sejtvonalakat 10% foetalis borjú szérumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) tenyésztettük (37 °C, 5% CO₂). A monolayer-ben növekvő sejteket 0.2%-os tripszin/EDTA oldattal kezeltük (0.53 mM, Sigma Aldrich, Németország), és standard PBS oldattal mostuk (pH: 7.2). Ezt követően a sejteket két részre osztottuk, egyik részükből genomiális DNS-t preparáltunk CGH analízishez, a sejtek másik részét pedig FISH analízishez készítettük elő. A kromoszóma preparátumokat kromoszómafestő próbával történő hibridizáláshoz standard protokollnak megfelelően készítettük és -20 °C-on tároltuk (47).

4.5. Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)

4.5.1 CGH-hibridizáció

A DNS hibridizációt Kallioniemi és mtsai. (54) által leírt módon végeztük, kisebb módosításokkal, melyeket röviden az alábbiakban ismertetek. Tumor és normál DNS-t fenol:kloroform:izo-amilalkohol (PCI, 26:25:1) oldattal extraháltuk proteináz K kezelést követően, standard protokoll alapján (47). Normál DNS-t egészséges egyén perifériás mononukleáris sejteiből izoláltunk. A DNS minták koncentrációját fluoriméterrel határoztuk

meg. A tumor és normál DNS-t nick-transzlációval, direkt jelzett d-UTP-vel megjelöltük a gyártó (Vysis Inc. Downers Grove, IL USA) protokollja alapján. A tumor DNS jelzése zölden fluoreszkáló SpectrumGreen-12-dUTP-vel, a normál DNS jelzése pedig vörösén fluoreszkáló SpectrumRed-5-dUTP-el történt. A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy a jelzett DNS fragmentumok hossza 300 és 2000 bázispár között legyen. A 200 ng jelzett tumor és normál DNS-t (külön-külön) 20 µg jelöletlen humán Cot-1 DNS-t (GIBCO) tartalmazó DNS keveréket 1 térfogat 0.3 M nátrium-acetát (pH: 5.3) és 100% hideg etanollal kicsaptuk. A DNS-t levegőn megszárítottuk és 10 µl hibridizációs oldatban (50% formamid, 10% dextranszulfát, és 2 X SSC (1 X SSC 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-citrát, pH: 7.0)) feloldottuk. A hibridizációs elegyet 73 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd 37 °C-on 30 percig állni hagytuk (preannealing lépés). A normál kromoszómákat tartalmazó CGH lemezeket (Vysis Inc.) 73 °C-on 3-5 percig denaturáltuk, majd emelkedő koncentrációjú etanol sorban (70%, 85%, 100%) dehidratáltuk. A hibridizációs elegyet tárgylemezre cseppentettük és légmentesen lezártuk. A hibridizáció 37 °C-on 72 órán át nedves kamrában történt. A hibridizációs lemezekről a nem hibridizálódott DNS-t az alábbiak szerint távolítottuk el: a lemezeket három egymást követő lépésben hibridizációs mosófolyadékban (50% formamid, 2 X SSC, pH: 7.0), majd kétszer 2 X SSC-ben (pH: 7.0, 45 °C), ezt követően egyszer 2 X SSC-ben és kétszer PN pufferben (0.1 M NaH₂PO₄, 0.2 M Na₂HPO₄, Nonidet P40, pH: 8.0, szobahőmérséklet, 10 perc) mostuk, majd a lemezeket ultratiszta vízben leöblítettük és levegőn megszárítottuk. A sejtmagokat anti-fade oldatban (Vysis Inc.) oldott 0.15 µg/ml 4,6-diamino-2-fenilindollal (DAPI) festettük. Egy negatív (különböző jelzésű normál-normál DNS) és egy pozitív kontrollt (SpectrumGreen-dUTP jelzett citogenetikailag részletesen jellemzett MPE-600 emlőtumor sejtvonal) használtunk a CGH eredmények validitásának biztosítására.

4.5.2. Digitális képanalízis

A CGH hibridizáció értékelésére Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóphoz mikroszkóphoz (Carl Zeiss, Jena, Németország) kapcsolt számítógép-vezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert alkalmaztunk (ISIS, Metasystem GmbH, Altlußheim, Németország). A fluoreszcens képek rögzítése (mintánként 8-10 metafázis) monokróm CCD kamerával történt (Compulog, IMAC-CCD-230, 8 bit felbontás, Metasystem GmbH). Minden metafázisról 3 fekete-fehér fluoreszcens képet rögzítettünk. A kék fluoreszcencia a kromoszómák azonosítására szolgál (DAPI festés), a zöld fluoreszcencia a hibridizálódott

tumor DNS-től, míg a piros fluoreszcencia a hibridizálódott normál DNS-től származott. Automatikus háttérkorrekciót követően megszerkesztettük a kromoszómák kariogramját a DAPI festés alapján. A kromoszómális eltérések meghatározása a zöld és vörös fluoreszcencia intenzitások aránya alapján, automatikusan minden metafázisra vonatkoztatva külön-külön történt. Az egyes metafázisokra vonatkozó kromoszóma profilokat átlagolva az adott tumorra jellemző átlag eltérések térképét kaptuk meg. A DNS többletként definiáltuk azokat az eltéréseket, melyeknél a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitásarány meghaladta az 1.15-öt. DNS vesztésnek definiáltuk azokat az eltéréseket, melyeknél ez az arány 0.85 alatti értéknek adódott. Ezeket az ún. diagnosztikai háttér értékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg. Tekintettel arra, hogy a Cot-1 DNS hatékonyan blokkolja a kromoszómák centroméra közeli heterokromatin régióit, ezeket a kromoszómális szakaszokat a CGH analízis során nem értékeltük.

4.6. Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH)

4.6.1. DNS-próbák eredete, jelzése és detektálása

Kísérleteink során centroméra és DNS-lókuszt specifikus próbákat alkalmaztunk. Az alábbi próbákat a Resource for Molecular Cytogenetics-től (University of California, San Francisco, Cancer Center, San Francisco, USA) kollaborációs kapcsolat keretében szereztük be: pUC1.77 az 1-es, p7 α tet a 7-es, pHU98 a 9-es, pLC11A a 11-es, pD15Z1 a 15-ös, p17H8 a 17-es kromoszómára, a pBamX7 az X kromoszóma centroméra régiójára specifikus. A 7p12-p13 lókuszt specifikus DNS-próbát ugyancsak az UCSF-ről szereztük be. A 4-es kromoszóma festő, valamint a 6-os, 8-as, 10-es, 12-es és Y kromoszómákra specifikus próbák az ONCOR-tól származtak (Gaithersburg, MD, USA). A DNS próbák módosítása direkt jelzett (SpectrumGreen dUTP és fluoreszcein dUTP, TexasRed és SpectrumRed dUTP) vagy indirekt jelzett nukleotidokkal (biotin-dUTP és digoxigenin-dUTP), nick-transzlációval alkalmaztuk (BioNick kit, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) történt a gyártó cég leírásának megfelelően (9, 10, 36, 37). A biotinnal módosított DNS-próbákat TexasRed vagy fluoreszcein-avidinnel, a digoxigeninnel módosított DNS szondákat monoklonális antitestekkel (anti-digoxigenin-fluoreszcein vagy antidigoxigenin-rhodamin), indirekt immun-fluoreszcenciával tettük láthatóvá.

4.6.2. FISH-hibridizáció

A FISH-t az irodalomban leírt protokoll alapján végeztük el (55, 56, 57), kisebb módosításokkal. Röviden: a tárgylemezen rögzített, fixált sejtmagokat és kromoszóma preparátumokat denaturáló oldatban (70% formamid/2 X SSC, pH: 7.0) 75 C°-on 2.5-5 percig denaturáltuk, majd ezt követően a sejteket emelkedő koncentrációjú (70%, 85%, 100%) hideg etanol sorozatban dehidráltuk és levegőn megszárítottuk. Centroméra specifikus próbáknál a hibridizációs elegy mintánként 4-20 ng DNS-próbát és 10 ng jelöletlen humán placentális DNS-t (Sigma) tartalmazott, melyet 73 C°-on 5 percig denaturáltunk és a szintén denaturált target DNS-hez adtuk. A hibridizáció 37 C°-n nedves kamrában történt egy éjszakán át. A nem kötődött DNS-próbákat a denaturáló oldatban (50% formamid/2 X SSC, 45 C°, 10 perc, háromszor) és 2 X SSC-ben (10 perc) történő mosással távolítottuk el. A hibridizálódott próbákat a korábban leírtak alapján detektáltuk. a lemezeket 50% formamid/2 X SSC oldatban mostuk 45 C°-n majd 2 X SSC-ben szobahőn (10 percig minden esetben). A sejtmagok jelzésére antifade-ben oldott diamino-fenilindolt (DAPI, kék fluoreszcencia), vagy propídium-jodidot (vörös fluoreszcencia) használtunk (Vectashield, Vector, USA) (58).

4.6.3. Fluoreszcens mikroszkópia

A FISH-sel kapott eredményeket Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) értékeltük 100 × nagyítású (NA 1.3) olaj-immérziós objektívvel. A gerjesztő fény (fényforrás 100 W teljesítményű higanygőz-lámpa) hullámhosszát megfelelő optikai szűrők alkalmazásával változtattuk. Emissziós szűrőnek a Pinkel-féle triple bandpas emissziós filterblokkot használtuk, mely alkalmas a kéken fluoreszkáló, sejtmagot jelző DAPI, a zölden fluoreszkáló fluoreszcein és SpectrumGreen, a vörösén fluoreszkáló TexasRed és SpectrumRed, vagy csak az ugyancsak magfestést szolgáló vörösén fluoreszkáló propídiumjodid vizualizálására. A fluoreszcens képek rögzítésére a Metasystems (Németország) által forgalmazott, FISH analízisre is alkalmas képanalizáló rendszert alkalmaztuk. A fluoreszcens képek rögzítése automatikus expozíciós idővel történt. Az értékeléshez az irodalomban leírt metodikát követtük: a sejtmagokban lévő fluoreszcens szignálok sejtenkénti száma alapján csoportosítottuk a sejteket, mintánként 100-200 sejtmagot analizáltunk. Minden hibridizációt kontroll hibridizációval egészítettünk ki, azaz egészséges egyénből származó perifériás limfocitákon is elvégeztük a hibridizációt. A tumor minták hibridizációját csak akkor értékeltük ki, ha a kontroll hibridizáció során a diploid sejtek

aránya 95%-nál magasabb volt. A 4-es kromoszóma festő próba esetében 60 metafázist értékeltünk ki. A centroméra specifikus próbákra vonatkozóan a kromoszóma indexet (összes szignál száma/sejtmagok száma) mint a kromoszómák mérőszámát Dhingra és tsai. (59) módszerével számoltuk ki.

4.7. DNS tartalom meghatározása áramlási citométerrel

A melanoma sejtvonalak DNS tartalmának meghatározása az irodalomban leírt protokoll alapján történt (10). A 2.2.-ben leírtak alapján a sejteket feltripszineztük, hideg PBS-el 1 x mostuk, lecentrifugáltuk, majd 70% etanolban fixáltuk 1 órán át 4 C°-on. A sejteket 50µg/ml RNase-zal (Sigma) kezeltük (37 C°-on 1 óra) majd ezt követően a sejtmagokat 10 mg/ml propidiumjodiddal (PI) megjelöltük. A DNS index meghatározása Becton-Dickinson FACScan áramlási citométeren CellFit szoftver alkalmazásával történt.

4.8. Immunhisztokémia

A feltripszinezett sejteket PBS-el 2 x mostuk, 50 µl PBS-ben felfuszpendáltuk és FITC-cel jelzett monoklonális anti-EGFR antitesttel 1 órán át inkubáltuk (45). A sejteket PBS-el mostuk, majd 1%-os formaldehid/PBS oldatban (pH:7.00) fixáltuk és a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük.

4.9. Statisztikai analízis

A kromoszómaszámbeli elváltozások és a kliniko-patológiai paraméterek (tumor méret, betegek kora, metasztázis megjelenése, stb.) közötti kapcsolat vizsgálatában kontingencia-táblázat analízist végeztünk, az adatokat Student t-teszt, ANOVA és a Fisher egzakt teszt segítségével hasonlítottuk össze. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük ha a p érték egyenlő vagy kisebb volt, mint 0.05.

5. EREDMÉNYEK

5.1. FISH és CGH módszerek adaptálása, melanoma sejtvonalak genetikai eltéréseinek analízise, a genetikai eltérések összehasonlítása

A FISH és CGH módszerek laboratóriumunkban történő beállításához és az eredmények irodalmi adatokkal történő összehasonlításához három citogenetikailag karakterizált melanoma sejtvonalat választottunk ki. A vizsgált sejtvonalak metasztázisképzés szempontjából eltérően viselkedtek, a WM35 korai stádiumú áttétet nem képző sejtvonal, az M24 kismértékű metasztázis képzéssel jellemezhető, míg az M24 sejtvonalnak a leszármazottja, az M24met igen agresszíven metasztatizáló sejtvonalnak bizonyult. A három sejtvonal irodalomban közölt citogenetikai adatai, valamint az általunk végzett áramlási citometriás mérések bizonyos támpontot nyújtottak a sejtek ploiditása és a várható genetikai eltérések tekintetében. A sejtek DNS indexe áramlási citométerrel történt meghatározást követően a WM35 sejtvonalra 1.47-nek (közel triploid), az M24 sejtvonalra 2.8-nak (hipertetraploid), az M24met-re pedig 1.89-nek (hipotetraploid) adódott.

FISH-sel mindhárom sejtvonal genetikailag heterogénnek mutatkozott, és a DNS index-el jó összhangban magas volt az emelkedett ploiditású klónok aránya (1. Táblázat). A DNS index alapján közel triploid WM35 sejtvonal FISH-sel az 1-es, 7-es és 15-ös kromoszómára vonatkozóan triszómiát mutatott a sejtek túlnyomó többségében. A 9-es kromoszómára 91%-ban monoszómia, a 17-esre 95%-ban diszómia volt jellemző. A vizsgált kromoszómák közül a 7-esnél két, a 15-ösnél három különböző kromoszómaszámmal jellemezhető sejtpopulációt találtunk. Az M24 és M24met sejtvonalakban szinte valamennyi általunk vizsgált kromoszómára döntően az aneuszómia volt jellemző, a domináns populáció kromoszómánként eltért. Az M24 sejtvonalban 17-es és az X kromoszóma alapvetően három, az 1-es kromoszóma négy, a 7-es és 15-ös kromoszómák hat-hat fluoreszcens szignált mutattak sejtenként, míg a 9-es kromoszóma heterogén eloszlást mutatott, kettőtől hét szignált sejtenként. Az M24met utód sejtvonalban az X kromoszóma alapvetően egy, az 1-es és 17-es kromoszómák kettő, a 9-es kromoszóma 3, a 7-es kromoszóma öt, a 15-ös kromoszóma hat fluoreszcens szignált mutatott sejtenként. Az M24 és M24met jelentős különbséget mutatott a 9-es kromoszóma eloszlásában, míg az eredeti sejtvonalban számos populáció (2-től és ≥ 7 kópia/sejt) jelen volt, addig az M24met-et a 9-es kromoszómaszám csökkenése jellemezte.

Ebben a sejtvonalban a 9-es kromoszóma két populációban volt jelen közel azonos megoszlásban.

1. Táblázat

Kromoszómák kópiaszám-eloszlása humán melanoma sejtvonalakban

Kromoszómák	1	7	9	15	17	X
Szignál/sejt						
WM 35						
0	0 ^a	0	1	0	0	1
1	1	1	91^b	12	1	92
2	15	4	8	30	95	7
3	72	89	0	48	1	0
4	4	1	0	5	3	0
5	4	1	0	2	0	0
6	4	3	0	2	0	0
≥7	0	0	0	0	0	0
M24						
0	0	0	2	0	2	0
1	0	0	5	1	16	10
2	10	2	12	5	11	15
3	16	3	10	12	71	75
4	69	16	14	16	0	3
5	3	15	20	30	0	0
6	0	54	18	32	0	0
≥7	0	7	20	4	0	0
M24met						
0	0	0	1	0	0	1
1	1	1	0	0	5	95
2	53	1	8	0	93	4
3	35	5	48	0	1	0
4	11	20	31	4	1	0
5	0	59	1	24	0	0
6	0	13	1	52	0	0
≥7	0	2	0	20	0	0

^aAz adott kromoszóma %-os megoszlása. Mintánként legalább 200 sejtet analizáltunk.

^bA domináns populációk vastag betűvel vannak kiemelve.

A három sejtvonalra vonatkozó CGH eredményeinket a 2. Táblázatban tüntettük fel. CGH-val a következő eredményeket kaptuk: a WM35 sejtvonalban DNS többletet vagy veszteséget mutatott az 1-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 8-as, 9-es, 11-es, 12-es, 15-ös, 16-os, 17-es és a 19-es kromoszóma. M24-ben és utódsejtvonalában közös genetikai eltérés volt a 7pter-q31.1,

8q, 11pter-q13.3 kromoszóma szakaszok DNS többlete és a 4q, 6q, 7q31.3-qter, 9p, 10p, 11q14.1-qter kromoszóma szakaszok deléciója. A 8p, 9q, 10q, 15q és 17q kromoszóma karokon mutató DNS többlet csak az M24 szülői sejtvonalban volt jelen.

2. Táblázat

CGH-val kimutatott genetikai elváltozások három melanoma sejtvonalban

Sejtvonalak	DNS nyerés	DNS vesztes	Eltérések száma (DNS vesztes/nyerés)
WM35	3p21.2-qter, 4q22-qter, 5pter-q31.3, 6pter-q16.2, 7q, 8q, 11p, 12pter-q23.3	1p, 4p, 6q16.2-qter, 8p, 9p12.1-qter, 15q, 16, 17p-q24.3, 19	17 (8/9)
M24	7pter-q31.1^a , 8, 9q, 10q, 11pter-q14.1 , 15q, 17q	4q, 6q, 7q31.1 -qter , 9p, 10p, 11q14.1-qter	13 (7/6)
M24met	3q22-qter, 5, 7pter-q31.3 , 8q, 11pter-q13.3	1p, 2p16-pter, 4q, 6q , 7q31.3-qter , 9, 10, 11q13.3-qter , 12q21.2-qter, 16, 17, 20, 22	18 (5/13)

^aVastag betűvel kiemeltük azokat a genetikai elváltozásokat, amelyek az M24 szülői és az M24met utódsejtvonalban közősek voltak

Az M24met sejtvonalban újonnan megjelenő eltérés volt az 1p, 2p, 4p, 9q, 10q, 12q, 16p, 16q, 17p, 17q, 20p, 20q és 22q kromoszóma karokat érintő deléció és a 3q, 5p, 5q kromoszóma karok DNS többlete. Az M24met-ben a 9q, 10q és 17q kromoszóma deléciót mutatott amplifikáció helyett (mindhárom kromoszóma szakasz a szülő sejtvonalban amplifikált volt).

Tekintettel arra, hogy a 7p11-12 szakasz regionális DNS amplifikációt mutatott az M24met sejtvonalban CGH-val, FISH-sel is tanulmányoztuk az ezen a szakaszon lokalizálódó EGFR-gén és a 7-es kromoszóma kópiaszám eloszlását. FISH-sel kapott adataink szerint az EGFR-gén a WM35 sejtvonal sejteiben nem amplifikálódott, de amplifikációt mutatott az M24 és az M24met sejtvonalban. Az utóbbi két sejtvonalon a sejtfelszíni EGF receptor fokozott expresszióját is megfigyeltük.

5.2. Kromoszóma vesztes szerepe a humán malignus melanoma progressiójában és a metasztázisképzésben (I. melléklet)

Az irodalomban alig néhány ugyanazon betegből származó primer tumor és metasztázisának genetikai eltéréseit hasonlították össze, valamint haploid kromoszóma készlettel rendelkező metasztatikus melanoma esetet közöltek. Ezért érdekesnek találtuk annak a primer melanomának és metasztázis tumor párjának a részletes interfázisos FISH analízisét, melyben a primer tumor közel diploid volt, de ugyanazon betegben a primer tumorral egyidőben felismert cutan metasztázis hipodiploidnak bizonyult. FISH vizsgálatunk során azoknak a kromoszómáknak a tanulmányozására koncentráltunk, melyeket sávozásos citogenetikával gyakori eltérésként írtak le melanomában.

3. Táblázat

A kromoszómák számbeli eloszlása primer melanoma tumorban és a tumor által adott cutan metasztázisban

Kromoszómák Szignál/Sejt	1	7	9	10	11	12	15	17	X	Y
Primer tumor										
0	1 ^a	2	0	4	0	3	2	2	0	92
1	30^b	3	33	31	9	6	34	30	29	8
2	62	87	63	65	79	33	57	66	65	0
3	6	3	4	2	6	20	6	2	1	0
4	1	5	0	2	6	38	1	0	0	0
Metasztázis										
0	0	0	96	5	7	2	1	0	2	14
1	61	4	1	75	17	26	78	68	80	83
2	38	83	3	13	69	53	21	31	19	3
3	1	2	0	4	7	9	0	1	0	0
4	0	11	0	3	1	10	0	0	0	0

^aAdott kópiaszámot tartalmazó sejtek százalékos aránya. Minden kísérletben legalább 200 sejtmagot értékeltünk.

^bAz aneuploid sejtpopulációkat (>10%) vastag betűvel kiemeltük.

A 10 centromera specifikus DNS próba primer és metasztatikus melanomán végrehajtott in situ hibridizációs eredményeink összefoglalása a 3. Táblázatban látható. A primer tumorban a sejtmagok többsége az 1-es, 7-es, 9-es, 10-es, 11-es, 15-ös és 17-es

kromoszóma esetében diszómias volt, bár fellelhetők voltak olyan sejtpopulációk is melyekben csak egy szignált figyelhettünk meg. A 7-es, 11-es és 12-es kromoszóma esetében a monoszómias kromoszóma frakció a teljes populáció kevesebb, mint 20%-át alkotta, ugyanakkor az 1-es, 9-es, 10-es, 15-ös és 17-es kromoszómánál ez az arány megközelítőleg 30% volt. A 12-es kromoszóma mindössze a sejtek 33%-ban volt diszómias, a fennmaradó populációban a sejtekben három vagy négy szignált detektáltunk. A primer tumorban szex-kromoszómák megoszlása abnormális volt, mindössze a sejtek 29%-a volt monoszómias az X kromoszómára, a domináns populáció két X kromoszómával rendelkezett. Az Y kromoszóma a primer tumor sejteinek 92%-ában deléciót mutatott. A maradék 8% sejtenként egy intenzív szignált adott, ami kizárja annak lehetőségét, hogy a 92%-ban deletált Y kromoszóma hibridizációs hibának lenne az eredménye. Ismételt hibridizáció hasonló eredményt szolgáltatott, továbbá a kontroll minták hibridizációja minden esetben 100%-osnak adódott, normális kromoszómaszám eloszlással. Primer tumor sejteken dupla-target (különbözőképpen jelzett DNS próbák) hibridizációt is elvégeztünk azzal a céllal, hogy vizsgáljuk a 9-es kromoszóma és 3 különböző kromoszóma egy sejten belüli eloszlásviszonyát. Erre a célra az 1-es, 15-ös és 17-es kromoszómákat választottuk ki, mert ezekre a kromoszómákra jellegzetes volt egy-egy monoszómias populáció. Páronként tanulmányoztuk a 9-es kromoszóma eloszlását az 1-es, a 15-ös és a 17-es kromoszómákkal. A biotinnal jelzett 9-es kromoszómát FITC-avidinnel, míg a digoxigennel jelzett 1-es, 15-ös, vagy 17-es kromoszómákat TRITC-el jelzett anti-digoxigeninnel jelenítettük meg. Két fő klónt találtunk, egyikben mindkét kromoszóma két kópiában volt jelen (kb. a sejtek 45%-ában), míg a másik populáció monoszómias volt (kb. a sejtek 25%-ában). Eredményeinket szemléletesen mutatja be az 1. Ábra.

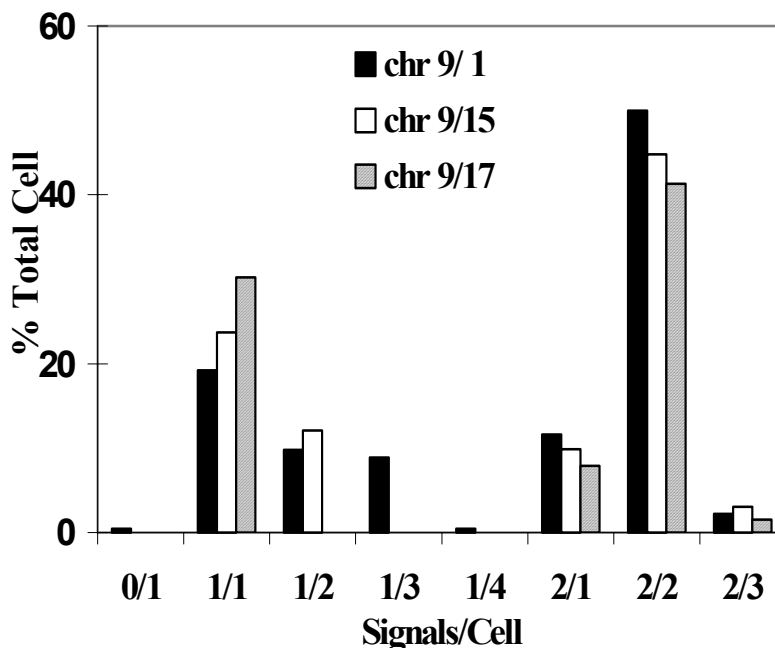
A cutan metasztázisban az 1-es, 10-es, 11-es, 12-es, 15-es és 17-es kromoszóma monoszómiája emelkedett volt a primer tumorhoz viszonyítva. A legfeltűnőbb deléciót a 9-es kromoszómán találtuk, egyik 9-es centroméra sem volt kimutatható. A másik fő különbség a szex-kromoszómák eloszlásában jelentkezett, a metasztázisban ezek eloszlása részben normális volt. A metasztatikus sejtek több mint 80%-ában az X és az Y kromoszóma is egy szignált adott. A 12-es kromoszóma fluoreszcencia mintázata szintén különbözött, a tri- és tetraploid sejtek száma lényegesen lecsökkent és a diszómia vált dominánssá a metasztázisban.

Ugyanezen beteg perifériás limfocitáin FISH-el nem találtunk eltérést, a sejtek több mint 90%-ában az 1-es, 7-es, 9-es, 11-es, 12-es, 15-ös és 17-es kromoszómára két fluoreszcens szignált detektáltunk. A szex-kromoszómák ugyancsak normál számban voltak jelen. A metafázisban lévő normál sejtek hibridizációja bizonyította, hogy az adott kísérleti

körülmények között minden próba specifikusan kötődött a megfelelő pericentromérikus DNS régióhoz.

1. Ábra

Melanoma sejtek kromoszóma kópiaszám eloszlása



A primer tumoron történt kettős jelzésű hibridizáció eredményeként a 9-es és az 1-es, 15-ös vagy 17-es kromoszómák szubpopulációinak eloszlása látható a szignálok száma szerint.

5.3. Kromoszóma instabilitás vizsgálata primer és metasztatikus melanomán CGH módszerrel (II. melléklet)

Annak ellenére, hogy malignus melanomák genetikai háttere még ma is kevésbé ismert, a CGH módszer bevezetése óta mindössze három közleményben foglalkoznak a melanomák teljes genomot átfogó genetikai analízisével. Ezek a tanulmányok a primer melanomában előforduló genetikai eltérések leírására irányulnak, metasztázisokra, primer és metasztázis tumor párokra nincs még CGH adat.

Vizsgálatunkban ezért CGH-t alkalmaztunk primer melanomákon, melanoma metasztázisokon és primer metasztázis tumorpárokon a fellelhető genetikai eltérések analizálására. A felhasznált tumorok klinikopatológiai adatait a 4. Táblázatban tüntettük fel.

4. Táblázat

Primer melanoma tumorok és melanoma metasztázisok klinikopatológiai adatai

Minta száma	Nem	Kor években	Lézió helye	Breslow vastagság	Clark szint	Tumor stádium
Primer tumorok						
1	Férfi	79	csípő	12	IV	T4N1M0
2	Nő	82	csípő	4	IV	T4N0M0
3	Férfi	68	has	3	IV	T3N1M0
4	Nő	39	hát	6	V	T4N0M0
5	Férfi	58	mellkas	5	IV	T4N0M0
6	Férfi	73	hát	4	IV	T4N1M0
7	Férfi	54	hát	6	IV	T4N0M0
8*	Nő	51	nyak	6	IV	T4N0M0
9	Férfi	39	mellkas	13	V	T4N1M0
10	Férfi	39	mellkas	4	IV	T4N0M0
11	Nő	46	hát	8	IV	T4N0M0
12	Nő	23	arc	10	IV	T4N1M0
13	Nő	24	láb	1.5	III	T3N0M0
14	Férfi	68	hát	6	IV	T4N0M0
15	Férfi	76	nyak	4	V	T4N0M0
16	Férfi	63	nyak	4	V	T4N0M0
Metasztázisok						
8m ^a	Nő	51	nyirokcsomó			
9m	Férfi	39	cutan			
12m	Nő	23	nyirokcsomó			
13m	Nő	24	nyirokcsomó			
17	Nő	63	nyirokcsomó			
18	Nő	73	nyirokcsomó			
19	Férfi	59	nyirokcsomó			
20	Férfi	45	nyirokcsomó			
21	Férfi	84	nyirokcsomó			
22	Férfi	63	nyirokcsomó			
23	Férfi	60	nyirokcsomó			
24	Férfi	63	nyirokcsomó			

^a A 8 és 8m, a 9 és 9m, a 12 és 12m, valamint a 13 és 13m jelzésű minták ugyanazon betegből származó tumor párokat reprezentálnak: a 8m és a 13m jelzésű nyirokcsomó metasztázisok 6 illetve 3 hónappal a primer tumor sebészi eltávolítása után, a 9m jelzésű cutan és a 12m jelzésű nyirokcsomó metasztázisok pedig a primer tumorról egyidőben kerültek eltávolításra.

5.3.1. Primer melanomában CGH-val kimutatott genetikai elváltozások

A CGH-val tanulmányozott primer melanomák kromoszómális eltéréseit a 2. Ábra szemlélteti. A leggyakrabban előforduló genetikai elváltozásokat az 5. Táblázatban foglaltuk

össze. Eredményeink szerint a primer tumorokban az eltérések átlagos száma 6.3-nak adódott, ami tumoronként változó számban oszlott meg 1-14 eltérés/tumor tartományban. A kromoszómális szakaszokon kimutatható DNS többlet gyakoribb volt, mint azok hiánya. A DNS többletek átlagos száma tumoronként 3.6-nak (tartomány1-10), a DNS veszteségek átlagos száma 2.7-nek adódott (tartomány: 0-6). A 18-as és 22-es kromoszómák kivételével valamennyi kromoszómán eltérést találtunk. Kis DNS szakaszra kiterjedő nagyfokú amplifikációt (zöld/piros fluoreszcencia intenzitás arány nagyobb, mint 1.5) is kimutattunk a következő régiókban: 1p12-p21, 1p22-p31 (mindkettő a 12-es számú mintában), 4q12-q13.3 (a 7-es számú mintában), 7q21.3-qter (a 11-es számú mintában) és 8q23-qter (a 15-ös számú mintában). A 7-es kromoszóma hosszú karjának nagymértékű DNS többlete, ami gén amplifikációra utal 3 tumorban volt található.

5. Táblázat

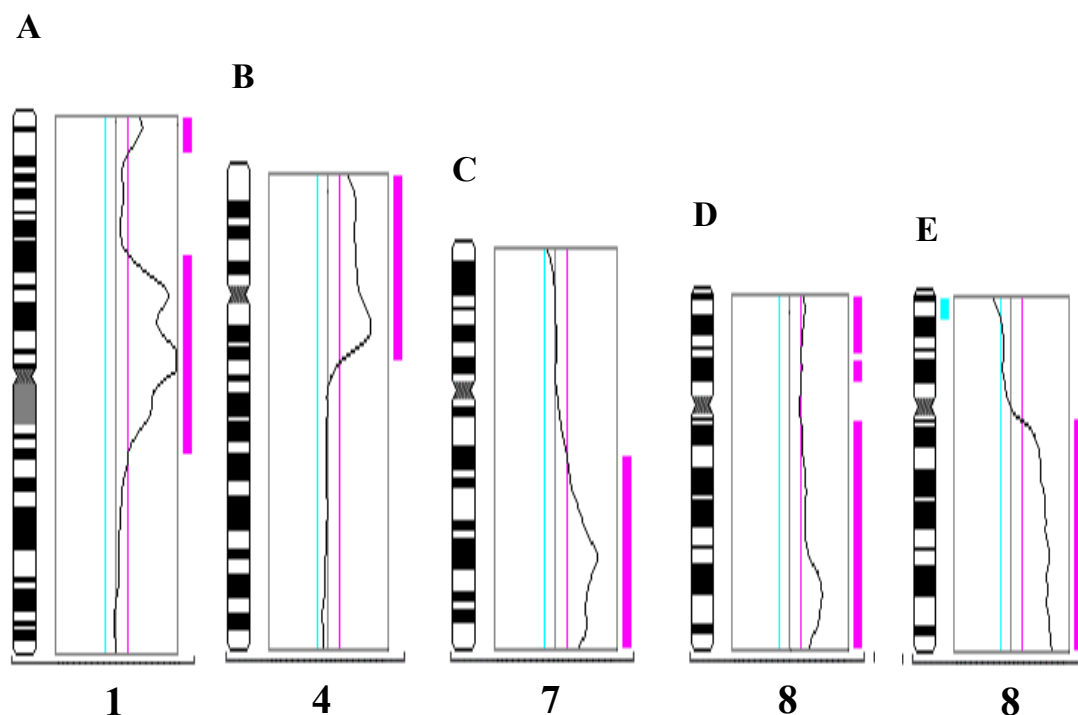
Kromoszóma specifikus genetikai eltérések primer melanomában és melanoma metasztázisban

Eltérés típusa	Kromoszóma kar	Primer tumorok Gyakoriság Eset/Össz (%)	Melanoma metasztázisok Gyakoriság Eset/Össz (%)
DNS többlet	6p	10/16 (63)	6/12 (50)
	8q	8/16 (50)	5/12 (42)
	1q	6/16 (38)	4/12 (33)
	7p	5/16 (31)	2/12 (17)
	7q	4/16 (25)	4/12 (33)
	1p	5/16 (31)	4/12 (33)
DNS veszteség	10q	10/16 (63)	6/12 (50)
	9p	7/16 (44)	7/12 (58)
	10p	5/16 (36)	4/12 (33)
	9q	4/16 (25)	6/12 (50)
	Y	4/10 ^a (40)	4/7 ^a (57)

^a A férfi betegek száma 10 volt a primer tumorok és 7 a metasztázisok esetén.

A leggyakoribb CGH-el látható elváltozás a 6-os kromoszóma rövid karjának többlete (63%) volt, ami egy tumorban (13-as beteg) a 6q kar elvesztésével társult. A 8q kromoszóma szakasz többletét a tumorok 50%-ában regisztráltuk, a legkisebb közös régió a 8q23-qter szakaszt érintette. Két tumorban (a 6-os és 7-es minta) a 8q többlet meghaladta 1.5 arányt, ami ugyancsak génamplifikációra utal. Hat tumorban az elváltozások az 1-es kromoszóma hosszú karját érintették (a legkisebb közös terület az 1q32-qter volt). További, gyakori

nyerések voltak a 7p és az 1p kromoszóma karokon (mindkettő 31%). Négy tumorban (1-es, 6-os, 7-es, 11-es beteg) az 1q, 6p, 7p és 8q eltérés együtt fordult elő. A csak primer tumorokban kimutatható DNS többlet a 2p és 15q szakaszokat érintette. Ezeket az amplifikációkat a 3. Ábra mutatja be.



3. Ábra

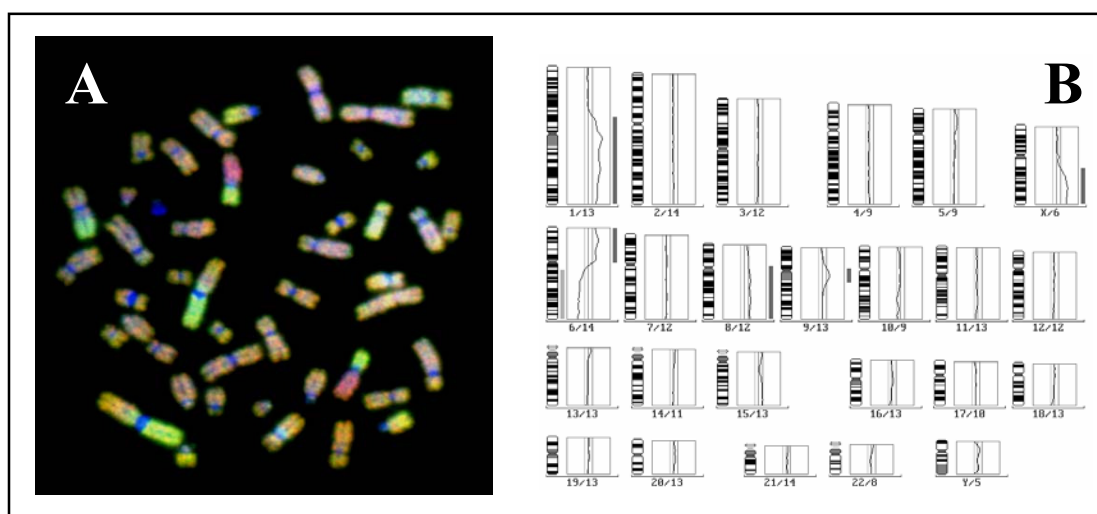
A kiválasztott CGH profilok a különböző primer melanoma tumorokban adott kromoszómákon megjelenő DNS amplifikációkat demonstrálják. A: 1-es kromoszóma (12-es számú minta), B: 4-es kromoszóma (7-es számú minta), C: 7-es kromoszóma (11-es számú minta), D: 8-as kromoszóma (7-es számú minta), E: 8-as kromoszóma (15-ös számú minta).

A leggyakoribb kromoszómavesztést a 10-es kromoszómán láttuk (63%, a legkisebb elveszett rész a 10q25-qter volt). Öt tumorban a teljes 10-es kromoszóma elveszett, egyben csak a 10q25-qter szakasz. A 9-es kromoszóma a tizenhat primer tumorból hétben volt érintett (44%). Négy tumorban teljes deléciót detektáltunk, háromban a deléció a 9p-re lokalizálódott (a legkisebb közös rész a 9p23-pter régió volt). Négy tumorban, ahol a 9-es kromoszóma nem volt érintve, a 10-es kromoszóma teljes vagy részleges vesztését detektáltuk. Az Y kromoszóma a férfi tumorok 40%-ában deléciót mutatott. További, a DNS vesztés szempontjából kevésbé frekvenciált kromoszómális szakaszok az 1p, 4q, 6q és 14q (mindegyik két-két esetben jelent meg). Egy tumorban a 6-os kromoszóma hosszú karjának DNS vesztése

csak a kar egy részét érintette (6q22-qter a 15-ös mintában). A következő kromoszómális veszteségek csak a primer tumorokban voltak kimutathatók: 1p, 3p, 12p, 14q, 19p és X.

5.3.2. Melanoma metasztázisokban CGH-val kimutatott genetikai elváltozások

Tizenkét melanoma metasztázist elemeztünk CGH-val. Ezek közül 4 esetben ugyanazon betegből származó primer tumor is rendelkezésre állt az analízishez. Egy metasztázis CGH hibridizáció mikroszkópos felvételét (4A) és a tumorra jellemző CGH kromoszóma profilt (4B) a 4-es ábrán mutatjuk be.

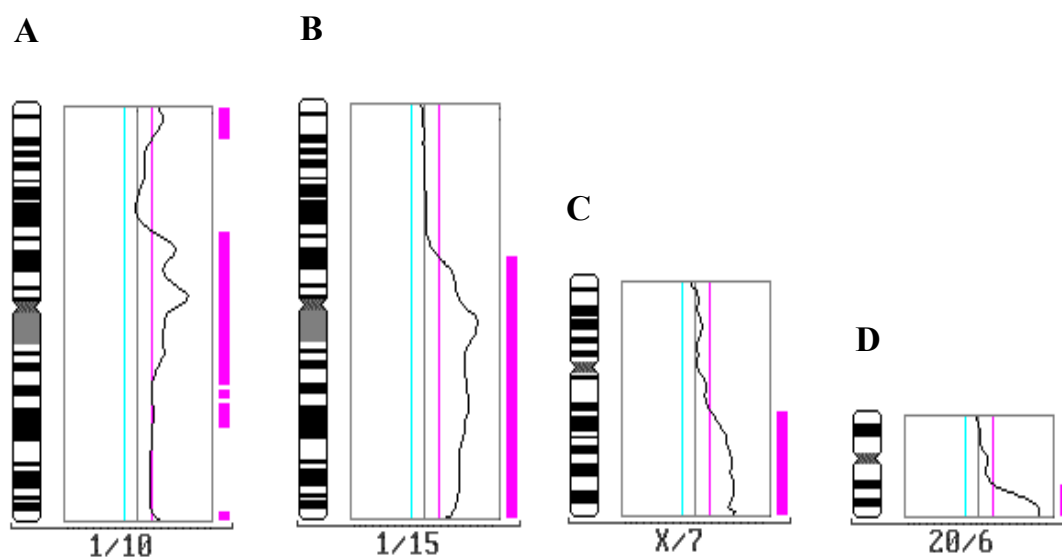


4. Ábra

A: Férfi páciens tumoros szövetmintájából származó metafázis kromoszómák CGH képe (18-as minta). A zöld színben feltűnő kromoszóma régiók a tumorban relatív DNS többlettel rendelkező szekvenciákat reprezentálják, a vörös területek pedig azokat, ahol a tumorban a DNS mennyisége csökkent a referencia DNS-hez képest. Az eltérést nem mutató kromoszómák a piros és zöld színek keveredése miatt narancssárga színben tűnnek fel. **B:** CGH profil. A kromoszóma ideogramok mellett a zöld és a vörös fluoreszcencia arányának átlagát ábrázoltuk a kromoszóma hosszának függvényében, a középső függőleges vonal az 1:1 arálynak felel meg. Ahol a relatív DNS többlet/vesztés mértéke meghaladta a küszöbértéket (a középső függőleges vonaltól jobbra/balra eső azzal párhuzamos vonalak) DNS kópiaszám változásról beszélünk, amit az adott szakaszok mellett megjelenő vastag vonal jelez. Minden profil alatt látható a kromoszóma száma és hogy ebből hányat értékeltünk.

Az 5. Ábrán a melanoma metasztázisokban előforduló kromoszómális eltérések összegzését tüntetük fel. Bár a genomot érintő eltérések átlagos száma a metasztázisokban magasabb volt, mint a primer tumorokban (7.8 a metasztázisokban és 6.3 a primer tumorokban), a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0.43$). A metasztázisokban a DNS többlet átlagos száma kissé magasabb volt (4.0/tumor), mint a DNS vesztesékeké

(3.5/tumor). A primer tumorokhoz hasonlóan a leggyakoribb kromoszóma eltérések a 6-os kromoszóma rövid karjának és a 8-as kromoszóma hosszú karjának többlete (50% és 42%) volt. Az 1p, 1q és 7q kromoszóma kar amplifikációja 4 tumorban (33%) volt jelen, míg a 3-as kromoszóma rövid karján 3 tumorban találtunk DNS többlet utaló jelet. Kis DNS szakaszra kiterjedő nagyfokú amplifikációt a következő régiókban találtunk: 1p12-p21, 1p22-p31, 1q, Xq21.1-qter és 20q13.1-qter, ezeket az eltéréseket a 6. Ábra mutatja be. Három metasztázisban (a 13m, 18 és 20-as számú minta) a 6p nyeres és 6q vesztes együttesen jelent meg. A következő eltérések csak a metasztázisokban voltak: 5p, 5q21-q23, 10p és 18q.



6. Ábra

A kiválasztott CGH profilok a különböző melanoma metasztázisokban adott kromoszómákon megjelenő DNS amplifikációkat demonstrálják. A: 1-es kromoszóma (12b jelű minta), B: 1-es kromoszóma (18-as számú minta), C: X kromoszóma (18-as számú minta), D: 20-as kromoszóma (17-es számú minta).

A metasztázisokban a 6-os kromoszóma rövid karjának DNS többlete mellett a 9-es kromoszómát érintő deléció volt a másik frekvenciált genetikai eltérés, a tizenkét tumorból tíz (83%) mutatott részleges vagy teljes 9-es vesztesést. Három tumorban a teljes 9-es kromoszóma elveszett, négy esetben csak a p kar, míg a maradék három esetben a q kar részleges elvesztése volt jellemző. A 10-es kromoszóma delécióját 7 metasztázisban mutattuk ki. A legkisebb közös szakasz a 10q25-qter volt. A 20-as számú mintában a 10q vesztes és a 10p többlet egybeesett. A 17-es kromoszóma DNS vesztesége metasztázisokban gyakoribb volt, 4 esetben fordult elő. Az Y kromoszóma elvesztése a 7 férfiból származó tumor közül négyben

jelen volt (57%). A csak metasztázisban előforduló eltérések közé tartoznak a 2p21-pter, 11q13-q23, 12q24.1-qter, 19q13.1-qter és 22qter szakaszok deléciói.

5.3.3. Ugyanazon betegből származó primer melanoma és metasztázisának összehasonlító elemzése

A genetikai különbségek felmérése céljából megvizsgáltunk 4 primer tumor-metasztázis párt. Az elváltozások összefoglalása a 6. Táblázatban található. Valamennyi metasztázisban megjelentek a primer tumorhoz képest új eltérések. A 8-as számú tumor a diagnózis felállításakor csak 1 eltéréssel rendelkezett (a 10q25-qter szakasz deléciója), míg a hat hónappal később megjelenő metasztázisban már 15 új eltérés is megjelent a 10-es kromoszóma deléciója viszont nem volt kimutatható. A 9-es számú primer tumorban ezzel szemben 7 eltérés volt, a vele egy időben eltávolított bőr metasztázisban pedig 9. A közös eltérés a 7q nyelés és a 9p veszteség volt. A harmadik tumor párban (12-es primer tumor) majdnem minden eltérés megegyezett a primer és metasztatikus lézió között. Metasztázisban talált új eltérés mindössze kettő volt, a 2p21-pter veszteség és a teljes 3-as kromoszóma többlete. Metasztázisban a teljes 10-es kromoszóma elveszett, míg a primer tumorban csak részleges deléció volt (10q24-qter). Az 1p12-p21 szakaszon mutatkozó kiemelkedő amplifikáció hasonló volt mindkét tumorban. A 13-as számú primer tumorban előforduló kromoszóma aberrációk a metasztázisban is megvoltak. A közös eltérésekhez társult a 7-es kromoszóma amplifikációja és a 9p21-pter régió deléciója metasztázisban.

6. Táblázat

CGH-val kimutatott kromoszómális elváltozások primer melanoma tumorokban és metasztázis páryukban

Tumor-minta jelzése	DNS többlet	DNS veszteség	Eltérések száma Össz(többlet/vesztés)
8		10q25-qter	1 (0/1)
8m	2q25-q32^a, 4q22-q28, 5q21-q23, 8q21-q23, 13q14-q32	1p33-pter, 9q34-qter, 12q24-qter, 16p, 16q23-qter, 17, 19q, 20, 21, 22	15 (5/10)
9	1q, 7q, 11q13-q21, 17q,	9p, 16q, Y	7 (4/3)
9m	7q, 8, 11q21-q22, 13q21-qter, 15q	6q25-qter, 9, 10q, 14q	9 (5/4)
12	1p12-p21, 1p21-p31.1, 1p36-pter, 4p15-p12, 5q21-q22, 6p, 17q	4q13-q12, 5q23-qter, 9, 10q24-qter, 12q12-qter, 17p	13 (7/6)
12m	1p12-p21, 1p21-p31.1, 1p36-pter, 3, 4p15-p12, 5q21-q22, , 6p, 17q	2p21-pter , 4q13-q12, 5q23-qter, 9, 10, 12q12-qter, 17p	15 (8/7)
13	6p, 8q	6q, 10	4 (2/2)
13m	6p, 7, 8	6q, 10, 9p21-pter	6 (4/2)

^aVastag betűvel vannak kiemelve azok a genetikai eltérések, amelyek csak az egyik lézióban fordultak elő.

5.3.4. A kromoszóma elváltozások és kliniko-patológiai paraméterek összehasonlítása primer melanomákban

Tumor vastagság: A kromoszóma eltérések átlagos száma a 4 mm vagy annál vékonyabb tumorokban (n=7) kevesebb volt (4.4 ± 4.5 eltérés/tumor), mint a 4 mm-nél vastagabb tumorokban (n=9, 7.4 ± 3.7 eltérés/tumor), de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (p=0.16). A 7-es kromoszóma többlete a vastagabb tumorokban gyakrabban fordult elő, 7 tumor, melyek vastagsága 4 mm-nél nagyobb volt, mutatta ezt az eltérést és a 7-es amplifikáció más kromoszómális eltérésekkel is társult.

A betegek életkora: Nem találtunk korrelációt a kromoszóma eltérések tumoronkénti száma és a betegek életkora között. A 60 év alatti és fölötti betegekben az eltérések átlagos száma közel azonos volt (6.3 ± 4.5 per tumor ≤ 60 év alatt (n=9; és 6.3 ± 4.7 per tumor > 60 év (n=7). A 60 évnél öregebb betegeknél minden tumorban felfedezhető volt a 8q kromoszóma többlete.

Metasztázis képzés: A primer tumorok sebészi reszekcióját követő egy éven belül metasztatizáló melanomákban és azon primer tumorokban ahol metasztázis szinkron jelen volt, az eltérések száma statisztikailag szignifikáns mértékben nagyobb volt (7.8 ± 4.1 , $n=12$), mint azokban az esetekben, ahol nem vagy csak később jelent meg a metasztázis (2.0 ± 1.4 , $n=4$, $p=0.017$).

5.4. Melanoma metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai eltérések azonosítása

A genetikai eltérések nagy száma és a melanomára jellemző jelentős mértékű genetikai instabilitás és heterogenitás igen megnehezíti az elváltozások értékelését. Ez azzal jár, hogy a metasztatizáló fenotípus szempontjából lényeges genetikai eltérések rejtve maradhatnak. Tímár és munkatársai metasztázishoz kapcsolódó marker-fehérjék expresszióját vizsgálva malignus melanomában azt találták, hogy a betegség klinikai stádiuma és a Breslow-féle tumor vastagság nem mutat összefüggést a fehérjék expressziójával. Szignifikáns különbség volt észlelhető azonban akkor, ha a tumorokat biológiai viselkedésük alapján csoportosították. Hasonló eredményre vezetett Petersen és mtsai.-nak a daganatok biológiai viselkedése alapján történő csoportosítás, melyet a genetikailag nagyon heterogén tüdőtumorokon végeztek el. CGH adatainkra a Petersen és munkatársai által alkalmazott csoportosítást mi is elvégeztük. Áttétet nem adó tumorok tekintettük azon primer tumorokat, melyeknél a diagnózis időpontjában a betegnek nem volt kimutatható metasztázisa, míg a metasztázisképző csoportot a diagnózis időpontjában már metasztázissal rendelkező primer tumorok és cután valamint nyirokcsomó metasztázisok alkották (továbbiakban metasztatizáló csoport).

Az esetszámot növeltük és biológiai viselkedésüknek megfelelően csoportosítva elemeztük a tumorokat. Tizenhét, a műtét időpontjában áttétmentes tumorból 15-ben találtunk CGH-val kimutatható genetikai eltérést (88%). A metasztatizáló csoportban 8 primer tumor volt, melyeknél a primer tumor diagnózisakor már a metasztázis is jelen volt. Ezt a csoportot még tizenkét nyirokcsomó és négy cután metasztázis egészítette ki. CGH-val minden metasztatizáló tumor mutatott kromoszómális eltérést.

A diagnózis időpontjában áttétet nem adó tumorok csoportjában átlagosan 4.35 (± 4.27) elváltozás/tumor volt kimutatható. A csoporton belül ezen átlagos elváltozásszám megoszlása különböző volt azon tumorok esetében, ahol 1 éven belül nem fejlődött ki metasztázis (7 primer tumor) és ahol kialakult az áttét (10 primer tumor). A metasztázist egy éven belül nem képező tumor csoportban 1.7 (± 2.07), az ugyanezen idő alatt metasztázist

képző csoportban 6.2 (± 5.51) volt az átlag kromoszóma-eltérés. A metasztatizáló tumorok csoportjában átlagosan 7.7 (± 6.61) elváltozás/tumor volt kimutatható. A leggyakrabban előforduló eltérések a metasztázist nem adó csoportban a 6p (53%), 8q (47%) és a 7q (29%) DNS szakaszok többlete és a 6q (35%), 10q (35%), 9p (29%), 9q (29%), 10p (29%) DNS szakaszok elvesztése volt. A metasztatizáló csoportban a leggyakrabban előforduló eltérések a 7q (67%), 7p (54%), 8q (54%), 1q (46%), 6p (42%), DNS régiók többlete és a 10q (63%), 9p (58%), 9q (50%), 6q (38%), kromoszóma karokon talált DNS veszteségek voltak. A 6p és 8q kromoszóma-szakaszok DNS többlete mindkét csoportban közel hasonló gyakorisággal jelent meg. Annak kimutatására, hogy van-e eltérés a genetikai aberrációk gyakoriságában a két csoport között a Fisher egzakt tesztet használtuk. A statisztikai analízis alapján a metasztatizáló képességhez kapcsolódó szignifikáns eltérésnek bizonyult a 7p és a 7q régiókban mutató DNS többlet ($p=0.025$ és $p=0.027$), illetve a teljes 7-es kromoszómán talált amplifikáció ($p=0.039$). Jelentős különbség volt a két csoport között a 9p és 10q kromoszóma szakaszok deléciója tekintetében is (mindkét eltérés gyakoribb volt az áttétet adó csoportban), de ez statisztikailag nem volt szignifikáns. A 10q kromoszómavesztés 7p és/vagy 7q kromoszóma többséggel vagy a teljes 7-es kromoszómát érintő amplifikációval való együttes előfordulása statisztikailag szignifikánsan gyakoribb volt a metasztatikus csoportban ($p=0.053$, illetve $p=0.050$).

7. Táblázat

Kromoszóma specifikus eltérések különböző biológiai viselkedésű melanoma léziókban

A CGH alterációk típusai	Kromoszóma kar	Áttétet nem adó melanomák ^a gyakorisága eset/összes (%)	Metasztatizáló melanomák ^b gyakorisága eset/összes (%)
DNS többlet	7p ¹	3/17 (18)	13/24 (54)
	7q ²	5/17 (29)	16/24 (67)
	7 ³	2/17 (12)	11/24 (46)
DNS vesztes	9p	5/17 (29)	14/24 (58)
	10q	6/17 (35)	15/24 (63%)

^aÁttétet nem adó tumornak tekintettük azon primer tumorokat, melyeknél a diagnózis időpontjában a betegnek nem volt kimutatható metasztázisa.

^bA metasztatizáló csoportot a diagnózis időpontjában már metasztázissal rendelkező primer tumorok és cután valamint nyirokcsomó metasztázisok alkották, továbbiakban metasztatizáló csoport (Petersen és mtsai. szerint).

¹A Fisher egzakt teszt alapján a 7p régió DNS többletének előfordulási gyakorisága szignifikánsan különbözött a nem-áttétéképző és az áttétéképző léziók csoportjában ($p=0.025$), csakúgy, mint a ²7q ($p=0.027$) és a ³teljes 7-es kromoszóma DNS többletének frekvenciája ($p=0.039$).

5.5. A máj-metasztatizáló képesség és a kromoszómális eltérések tanulmányozása CGH és FISH módszerekkel (III. melléklet)

A távoli melanoma metasztázis molekuláris aspektusainak vizsgálatához három, egymásból kialakított és immunszuppresszált egérben különböző máj-metasztatizáló képességgel rendelkező sejtvonalat tanulmányoztunk modellként. A CGH, FISH és áramlási citometria módszereket kombináltuk annak érdekében, hogy az egyik sejtvonal extrém magas metasztatikus potenciáljának hátterében álló genetikai elváltozásokat kiderítsük. CGH-val kapott eredményeinket a 8. Táblázatban foglaltuk össze.

8. Táblázat

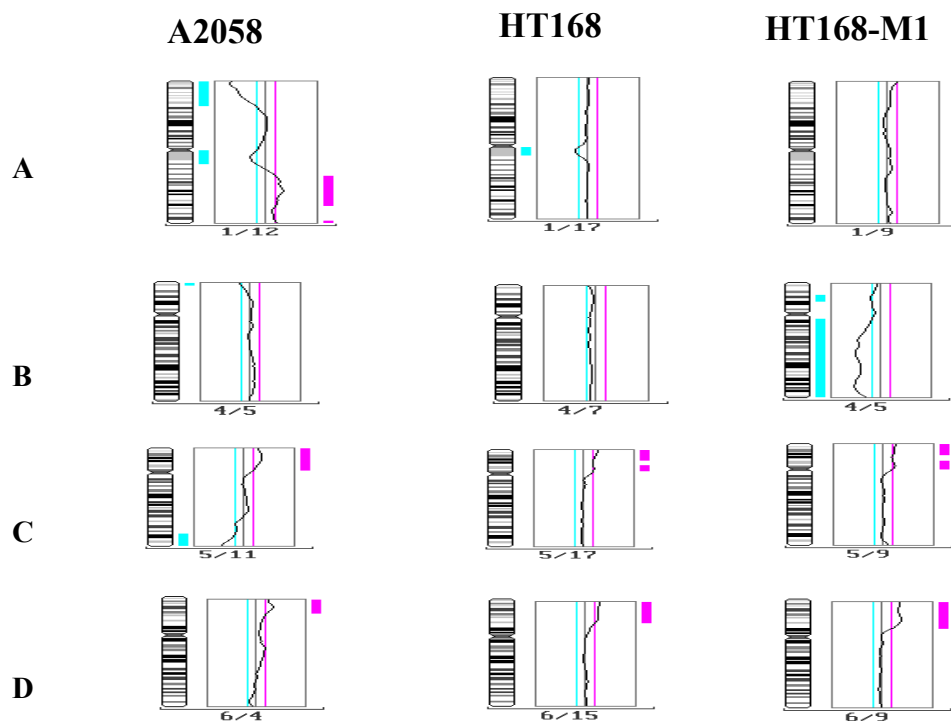
Melanoma sejtvonalakon CGH-val kimutatott genetikai elváltozások és a sejtvonalak által immunszuppresszált egérben létrehozott máj-metasztázisok száma

Sejtvonalak	DNS többlet	DNS veszteség	Összes eltérés (többlet/vesztés)	Májmetasztázisok száma immunszuppresszált egérben (tartomány)
A2058	1q34-qter, 5p , 6p22-pter , 7, 8q , 13q	1p33-pter, 5q32- qter, 8p, 9q, 10, 14q, 15q, 16p, 17p	15 (6/9)	0-22
HT168	5p , 6p21.3-pter , 8q21-qter , 13q		4 (4/0)	0-5
HT168-M1	5p , 6p21.1-pter , 8q21-qter , 13q	4, 9p21.3-pter, 10p	7 (4/3)	> 250

^aA vastag betűvel vannak kiemelve azok a genetikai eltérések, amelyek mind a három melanoma sejtvonalban közösen előfordultak.

A legtöbb genetikai eltérést a szülő sejtvonalnál (A2058) találtuk, 15 különböző DNS lókuszt érintett. Az összes sejtvonalban közösen megjelent az 5p, 6p22-pter, 8q21-qter és 13q kromoszómák többlete, ami a sejtvonalak közötti klonális kapcsolatra utal. A szelekciós folyamat során a leszármazott sejtvonalakban nem jelent meg új DNS többlet. Olyan kromoszómavesztést, ami minden sejtvonalban közös lett volna, nem találtunk. DNS többlet mutatkozott a 6p régióban, ami a szülői sejtvonalban (A2058) a 6p22-pter, az első leány-sejtvonalban (HT-168) a 6p21.3-pter, míg a nagyon metasztatizáló sejtvonalon (HT-168M1) volt a legkiterjedtebb, a 6p21.1-pter régióban. A különböző mintázat valószínűleg melanoma sejtvonalakban jelenlévő genetikailag heterogén szubklónoknak tulajdonítható. A közös eltéréseken túl, az A2058 sejtvonalban az 1q34-qter kromoszómaszakasz és a 7-es kromoszóma mutatott DNS többletet, DNS szekvencia-vesztést az 1p33-pter, 5q32-qter, 8p,

9q, 10, 15q, 16p és 17p kromoszóma lokuszokon detektáltunk. A HT168 csak a közös kromoszóma-többleteket mutatta, de ebből a sejtvonalból származó agresszív metasztatizáló hajlammal jellemzhető HT168-M1 sejtvonalban további elváltozások jelentek meg. Ezek az eltérések magukba foglalták a 4-es kromoszóm, a 9p21.3-pter és 10p kromoszóma szakaszok delécióját. Az a genetikai eltérés ami a szülő sejtvonalban és a nagyon metasztatikus variánsban megvolt, de az első leszármazott sejtvonalból hiányzott a 10p kromoszóma régióban talált DNS vesztes volt.



7. Ábra

A kiválasztott CGH profilok a három melanoma sejtvonalban adott kromoszómákon megjelenő DNS amplifikációkat és deléciókat demonstrálják. A: 1-es kromoszóma, B: 4-es kromoszóma, C: 5-ös kromoszóma, D: 6-os kromoszóma az A2058, HT168 és HT168-M1 sejtvonalakon. (A CGH profil alatt elhelyezkedő számok közül az első az adott kromoszómát a második az analizált kromoszóma mennyiségét jelenti).

Az A2058-ban a teljes 10-es kromoszóma elveszett, míg a HT168-M1-ben csak a kromoszóma rövid karja. A 4-es kromoszóma deléciója, a 9p21.3-pter kromoszóma szakaszokon kimutatott DNS vesztes csak az agresszíven metasztatizáló HT168-M1 sejtvonalban volt jelen.

9. Táblázat

Kromoszóma kópiaszám eloszlás melanoma sejtvonalakban

Kromoszómák	1	6	7	8	9	10	11	13	15	17	18	X	Y
Szignál/sejt													
A2058													
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10
1	8	1	60^a	1	2	4	3	0	0	0	6	93	83
2	81	95	38	13	90	91	84	15	94	94	88	6	7
3	7	4	2	82	3	5	4	79	1	1	3	0	0
4	4	0	0	0	5	0	9	2	5	5	3	0	0
≥5	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0
HT168													
0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
1	4	2	1	1	1	3	11	0	2	1	1	92	0
2	78	90	92	86	83	79	79	7	90	90	95	8	0
3	9	1	7	1	3	4	2	38	2	5	3	0	0
4	9	7	0	9	13	10	6	41	5	4	1	0	0
≥5	0	0	0	3	0	4	0	14	0	0	0	0	0
HT168-M1													
0	5	0	1	0	0	0	3	0	1	1	0	0	0
1	5	4	3	4	1	3	8	1	25	4	2	92	0
2	90	86	93	87	91	82	87	3	73	90	92	8	0
3	0	4	2	5	1	3	1	89	1	1	2	0	0
4	0	6	1	4	7	12	1	2	0	4	4	0	0
≥5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0

^aVastag betűvel kiemeltük az aneuploidiát mutató sejtklónokat.

A kromoszómák aneuszómiájának értékelésére centroméra közeli DNS szakaszokra specifikus FISH próbákat alkalmaztunk (9. Táblázat). A szülő sejtvonalban, amiben a legnagyobb számú CGH eltérést detektáltuk, a kromoszómák többségére diszómia volt jellemző, kivételt képezett a 7-es, 8-as és 13-as kromoszóma. A 7-es és 8-as kromoszómák aneuploidiáját mutató sejtklónok valószínűleg képtelenek voltak *in vivo* növekedni, ezért tűntek el a leszármazott sejtvonalakból. A szülő és a HT168-M1 sejtvonalak jelentős hányada 13-as kromoszóma triszómiát mutatott (79% és 89%). A HT168 sejtvonal heterogénebb volt erre a kromoszómára, a sejtek 38 %-a triszómiás, 41 %-a tetraszómiás volt. A 13-as kromoszóma aneuszómiája a CGH eredményekkel jó egyezést mutatott, mindhárom sejtvonalban a 13-as kromoszómán DNS többletet találtunk. Habár az A2058-ra két fő sejt populáció volt jellemző a 7-es kromoszómára (60% monoszómia és 38% diszómia), meg kell

jegyeznünk, hogy a diszómias sejtekben a két szignál közül az egyik normál méretű, fényes szignálfolt volt, míg a másik 3-8 kisebb fluoreszcens pöttyből állt, ami centroméra fragmentáció jele.

A fő különbségek a szülő és a két származtatott sejtvonal között az Y kromoszóma vesztés és az 1-es kromoszóma megnövekedett centromera szignálja volt. A HT168-M1-ben a 15-ös kromoszóma monoszómia a sejtek 25%-ában volt jelen, míg a másik két sejtvonalban a 15-ös monoszómia elhanyagolható volt. A FISH adatokból meghatározható és a kromoszóma szám kvantitatív mérőszámaként alkalmazott kromoszóma index az A2058-ban 1.90-2.10, a HT168-ban 2.00-2.22 és aHT168M1-ben 1.70-2.04 közötti értékeknek adódott.

A 4-es kromoszóma deléciójának részletesebb vizsgálatához teljes kromoszómát festő 4-es próbát is alkalmaztunk. A HT168-ban két normál kópiát találtunk, az A2058-ban két különböző klónt figyeltünk meg. Egyikben két normál kópia volt jelen (89%), a másikban csak egy 4-es kromoszóma festődött (11%). A HT168-M1 túlnyomóan monoszómiás volt (84%) a 4-es festő próbával de egy hosszú kar deléciót mutató klónt is megfigyeltünk (16%). Ennek a két klónnak az együttes jelenléte nagyon jó összhangban áll CGH-val kapott kromoszóma profillal.

6. MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt évtizedben a kromoszómális eltérések kimutatását célzó molekuláris genetikai módszerek a daganat kutatásban egyre jelentősebb szerepet kaptak (60). Ezek közül a metodikák közül kiemelendő a FISH és CGH technika. Tanulmányaink során ezt a két módszert alkalmaztuk a primer és metasztatikus melanomákban előforduló genetikai eltérések leírására és annak kiderítésére, hogy milyen a tumor progresszióval és az agresszív metasztázis-képzéssel összefüggő kromoszómális eltérések vannak malignus melanomákban.

6.1. FISH és CGH módszerek adaptálása, melanoma sejtvonalak genetikai eltéréseinek analízise

Három, különböző metasztatikus potenciállal rendelkező, sejtvonalat vizsgáltunk molekuláris genetikai módszerekkel. Célunk a CGH és FISH módszerek beállítása, az általuk nyert információk összehasonlítása, valamint a sejtvonalak részletes genetikai jellemzése volt. CGH-val mindhárom sejtvonalra a genetikai eltérések magas száma volt jellemző. A legtöbb kromoszómális aberrációt az M24met sejtvonalnál regisztráltuk (az összes eltérések száma 18), míg az M24 szülő sejtvonalban kevesebb amplifikációt és deléciót lehetett megfigyelni (összesen 13 eltérés).

Az alacsony metasztatikus hajlamú triploid WM35 sejtvonalon feltűnően sok eltérés mutatkozott CGH-val (összesen 17). Ez azzal magyarázható, hogy a CGH a sejtek kromoszómakészletének átlagos változását mutatja meg. Mivel a CGH-val kimutatott DNS vesztések és nyerések értékelésénél az elváltozásokat egy átlagosan négy vagy több kópiát tartalmazó alapkészlethez kell viszonyítani, ily módon bizonyos eltérések nem is kerülnek észlelésre. Olyankor fordul ez elő, ha a kiegyenlítetlen kromoszómakészletet hordozó sejtek nem képviseltek elegendően nagy populációt abban a szövetben, amelyből a vizsgált DNS származott. A FISH-sel kapott adatok szerint mind a három sejtvonal aneuploid volt. WM35-ben az adott kromoszómákra az aneuszómia aránya kisebb volt, mint a melanoma progresszió előrehaladottabb stádiumát képviselő M24 és M24met sejtvonalak esetében. Az egyedi sejtek DNS tartalmának mérésével az áramlási citometria megfelelő háttér információt biztosított és jó egyezést mutatott a FISH eredményekkel.

A különböző módszerekkel észlelt genetikai eltérések megjelenése kiterjedt DNS mutációk eredménye. A genetikai kiegyensúlyozatlanságból eredő mutációk többsége valószínűleg

random esemény, és csupán kis része szolgál rákos sejtklón kialakulásához elegendő szelekciós előnnyel. Ezek mellett molekuláris (cito)genetikai tanulmányok melanomában több, nem-random módon előforduló genetikai eltérést is találtak az 1-es, 6-os, 7-es, 9-es és 10-es kromoszómán (20, 21).

Mind az M24-ben, mind az M24met-ben jelen volt a 7p (és a 7q részleges) amplifikációja. A 7p12 kromoszóma régió tartalmazza az EGFR proto-onkogént, ami azért fontos, mert az EGFR expresszió korrelál a melanoma agresszivitásával (33, 61, 62, 63). A korábbi tanulmányokkal egybehangzóan, a kevésbé metasztatikus WM35-ben nem volt 7p (EGFR) amplifikáció, míg a metasztatikus M24 és az agresszív metasztatikus M24met-ben 7p amplifikációt kaptunk, ami összefügg az EGFR onkogén amplifikációjával, mivel az M24 és M24met sejtvonalon FISH segítségével kimutattuk az EGFR gén emelkedett számát, monoklonális antigén segítségével pedig a sejtek felszínén az EGF receptort mindkét sejtvonal esetén.

Irodalmi adatok alapján a metasztatizáló képesség kialakításában jelentős szerepet játszó másik eltérés a 10-es kromoszóma részleges vagy teljes vesztese, amit igazolni látszik, hogy a WM35 nem mutatta ezt az elváltozást, ellenben a metasztatikus M24 sejtvonalban 10p régió deléciója az agresszíven metasztatikus M24met-ben pedig a teljes 10-es kromoszóma elvesztése volt kimutatható. A 10q23.3 és a 10q24-q25 ismert tumor szuppresszor gének vannak, úgymint PTEN és MXI1 gén (30, 64). Valószínű, hogy az ismert onkogének és tumor szuppresszor gének mellett a 7-es és 10-es kromoszómán még több olyan gén is helyet foglal, melynek elvesztése hozzájárul a metasztatizáló-képesség kialakulásához és a tumor agresszivitásához (41, 65).

A kapott CGH és FISH eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a metasztatikus képesség megszerzéséhez a 7-es és 10-es kromoszóma aberrációja különösen fontos, emellett pedig a metasztatikus hajlam kialakításában szerepet játszik még a sejtvonal aneuploiditása és a jelenlévő szubklónok száma. Utóbbi fontosságát az adja, hogy a tumoron belüli heterogenitás fokozódásával nő a metasztázis kialakulásához vezető szubklónok megjelenésének valószínűsége. A CGH módszer értéke a kromoszóma eltérések azonosításában mutatkozik, illetve segíthet tumor-specifikus FISH próbák előállításában. Mindez lehetővé teszi, hogy a prognosztikai szempontból fontos genetikai információkhoz pár napon belül hozzájussunk.

6.2. Kromoszóma vesztés szerepe a humán malignus melanoma progressziójában és a metasztázisképzésben

A tumor progresszióban szerepet játszó genetikai eltérések kiderítésére az egyik leghatékonyabb megközelítés az, ha ugyanazon betegből származó primer tumor és metasztázisa közötti genetikai eltéréseket hasonlítjuk össze. Melanomákra vonatkoztatva ezen a területen az ismeretek rendkívül hiányosak, kísérleteink megkezdésekor mindössze 4 tumorpár analízise valósult meg (66, 67). Ezen túlmenően, az irodalomban alig néhány hipodiploid kromoszóma készlettel rendelkező metasztatikus melanoma eset jelent meg (68, 69), mivel más tumorokhoz hasonlóan, melanomában is a hipotetraploid állapot a leggyakoribb. Mivel ennél a primer és metasztázis tumor párnál a primer tumor közel diploid volt a metasztatikus párja pedig hipodiploid volt, részletes analízisük különösen érdekesnek ígérkezett. A férfi betegből származó primer melanomában és annak bőr metasztázisában megjelenő kromoszómális eltéréseket tíz különböző centroméra specifikus próba alkalmazásával tanulmányoztuk interfázisos FISH-sel. A tumorok kromoszómális eltéréseinek összehasonlítása egyértelműen jelzi a klonális progressziót. Eredményeink szerint a primer tumorban megfigyelhető kromoszómavesztés a metasztázisban ugyancsak megjelenik. A metasztázisban és a primer tumorban is detektált 1-es, 10-es, 12-es, 15-ös és 17-es kromoszómák monoszómiája azt jelzi, hogy a primer tumorban még ha kis százalékban is, de jelenlévő hipodiploid sejtklónok fontos szerepet játszanak az agresszív viselkedésben, és jelenlétük prediktív értékű lehet a tumor későbbi viselkedésére nézve (21, 70, 71). Az általunk talált kromoszómális veszteségek nemcsak erre a tumor párra jellegzetesek, Wiltshire és munkatársai a melanoma előrehaladott stádiumához tartozó daganat sejteken a tumor mikrodisszekcióját követően CGH-val ugyanezekben a kromoszómákban mutatott ki DNS veszteségeket (45). Ezeknek a kromoszómáknak a teljes vagy részleges elvesztése utalhat a melanoma progresszióban szerepet játszó onko-szuppresszor gén alterációk jelentétére. Az intenzív kutatások ellenére az egyetlen gén, melynek döntő szerepet tulajdonítanak a cután malignus melanomák predispozíciójában a *CDKN2A* gén, melynek kromoszómális lokalizációja a 9p21-es régió (72). Az általunk tanulmányozott primer tumorban is megfigyeltünk egy sejtpopulációt, melyre jellemző volt ennek a kromoszómának a monoszómiája, a 9-es delécia a metasztázisban tovább fokozódott. A 9p21 szakasz delécióját melanomában korai genetikai eseménynek tekintik, de arra vonatkozóan is jelentek meg már közlések, hogy szerepet játszik a tumor progresszióban is (25, 73, 74, 75) Feltételezhetjük, hogy hipodiploid klónokban olyan kritikus genetikai eltérések akkumulálódnak, melyek együttes jelenléte fokozott növekedéssel társul.

A fentiekben említett kromoszómaszám eltérések mellett érdekes eloszlást mutatott a tanulmányozott tumorpárban a szex kromoszómák megoszlása. Az X kromoszóma diploid volt a primer tumorban, de normális eloszlást mutatott a metasztázisban. Az Y kromoszóma a primer tumorban csak a sejtek kis százalékában volt jelen, ugyanakkor a metasztázisban ez a primer tumorban alulreprézektált klón jelent meg dominánsan. Feltételezzük, hogy az Y kromoszóma elvesztése inkább a korrall összefüggő alteráció és nem járul hozzá a malignus fenotípushoz, deléciója elhanyagolható az áttétképzés folyamatában. Ezt a feltételezést más tanulmányokban közölt eredmények is alátámasztják (76).

A FISH módszer alkalmazásával elsőként sikerült leírunk ugyanazon betegből származó primer és metasztatikus melanoma tumor-pár interfázisos citogenetikai analízisét. Az elvégzett interfázisos citogenetikai vizsgálat azt mutatta, hogy a különböző kromoszóma vesztések nem csak az általunk vizsgált tumor progressziójában, de annak iniciációjában is szerepet játszott.

6.3. Kromoszóma instabilitás vizsgálata primer és metasztatikus melanomán CGH módszerrel

Tanulmányunk az első olyan CGH közlemény, melyben primer és metasztatikus melanomák együttes analízise valósult meg (41, 45, 46). Eredményeink konzisztensek a korábban primer melanomára közölt CGH adatokkal (41, 45, 46), hasonlóan a Bastian és munkatársai által talált eltérésekhez a leggyakoribb kromoszómális alterációk az 1-es, 6-os, 7-es, 9-es és 10-es kromoszómákon jelentkeztek (41, 46). Ugyanakkor olyan kromoszómális eltéréseket is azonosítottunk CGH-val, melyek ezekben a tanulmányokban nem szerepeltek. Kiemeljük a melanomákban eddig még nem detektált regionális amplifikációkat, melyeket az 1p12 és 1p22-p31 lókuszon fedeztünk fel. Megállapítottuk, hogy mind a primer mind a metasztatikus melanomákban a 6-os kromoszóma rövid karjának DNS többlete a leggyakoribb eltérés és hasonlóan a korábbi megfigyelésekhez ez az alteráció számos más eltéréssel asszociálódott, jelezve ezzel azt, hogy ennek a lókusznak az érintettsége a tumor progresszió késői lépésének tekinthető. A klasszikus citogenetikai vizsgálatok során megfigyelték, hogy a 6p amplifikáció gyakran a kromoszóma hosszú karjának deléciójával együtt jelentkezett, ezért feltételezték, hogy az ilyen típusú CGH mintázat izokromoszóma kialakulásával, vagy más strukturális eltéréssel hozható összefüggésbe (32). A 6p szakaszon a DNS többlet fokozott gyakorisága onkogén jelenlétére utal a kromoszóma rövid karján, bár melanoma-progresszióval összefüggésbe hozható onkogént még nem találtak ezen a

kromoszómális szakaszon. Thompson és munkatársai metasztatikus melanomák kromoszóma sávozással történő analízise során gyakran találták a 6-os kromoszóma eltéréseit (20). CGH eredményeinkkel ellentétben azt figyelték meg, hogy a 6q szakasz elvesztése gyakoribb volt, mint a 6p szakasz DNS többlete. A CGH és citogenetikai adatok közötti hasonló ellentmondást írtak le uveális melanomákban, melyekben a 6p szakasz DNS többlete CGH-val gyakoribbnak adódott, mint kromoszóma-sávozással (77). Ez az ellentmondást az *in vitro* sejtttenyésztésben rejlő szelekciós folyamatnak tulajdonítható. A 6-os kromoszómán talált eltérések mellett gyakori kromoszómális alterációnak mutatkozott a 8-as kromoszóma hosszú karján megjelenő DNS többlet. Ez a megfigyelés azért is jelentős, mert ezt a kromoszómális szakaszt a citogenetikai vizsgálatokban nem említik, mint melanomában gyakran megjelenő kromoszómális alterációt. A 8q szakaszon lokalizálódó onkogének közül a C-MYC szerepe vetődik fel. Erre vonatkozó irodalmi adatok azonban eléggé ellentmondásosak (36, 78). A kérdés megválaszolása csak nagyszámú, különböző stádiumú tumor analízisével lehetséges. Az a megfigyelésünk, melynek értelmében a 8-as kromoszóma alterációja gyakran 6p, 7 és 1q kromoszómális szakaszokkal együttesen jelentkezik, arra utal, hogy ezeknek az eltéréseknek az együttes jelentkezése összefüggésbe hozható a melanoma agresszív biológiai viselkedésével.

Az irodalomban megjelent tanulmányok alapján feltételezhető, hogy a 7-es kromoszómán jelentkező DNS többlet a tumor progresszió késői lépése, hiszen gyakrabban jelentkezett a vastagabb tumorokban (41, 46). A 7p kromoszóma kar DNS többlete valószínűleg kapcsolatba hozható a 7p12-p13 lokuszon található EGFR gén amplifikációjával, mint arra melanoma sejtvonalak vonatkozásában már utaltunk. Trent és munkatársai rámutattak arra, hogy azok a betegek, akinek tumorában abnormális 7-es vagy 11-es kromoszóma volt jelen, szignifikánsan rövidebb túlélést mutattak (79). Tanulmányunk mérete és a követési idő rövidsége miatt a genetikai elváltozások és a klinikai adatok közötti korreláció kimutatására nem volt lehetőség, ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy négy beteg 2 évvel a betegség diagnosztizálása után elhunyt és hét másik betegben a metasztázis vagy szinkron jelen volt a primer tumor diagnózisánál, vagy a primer tumor eltávolítása után 1 éven belül kialakult. Ezen tumorok mindegyikében kimutatható volt a 7-es kromoszóma eltérése, ezek a megfigyelések további adatokat szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a malignus melanomában a 7-es kromoszóma és az agresszív fenotípus között szoros kapcsolat áll fenn.

CGH analízisünk több regionális amplifikációra hívta fel a figyelmet, ezek közül a 4q12-q13.1, a 7q21.3-qter és a 8q23-qter amplifikációk csak a primer tumorban, míg a 20q13-qter amplifikáció csak melanoma metasztázisban fordult elő. Mindkét vizsgált

alcsoportban kiemelt amplifikációt találtunk az 1p12-p21 és az 1p22-p31 DNS lókuszokon. A legkisebb átfedést mutató kromoszóma szakaszok, vagy fokozott amplifikációt mutató lókuszok részletes vizsgálata magában rejti új, a melanoma patogenezisével összefüggő tumor szuppresszor gének és onkogének felfedezésének lehetőségét is. A DNS szakaszok többlete mellett a korábbi adatok figyelembevételével várható volt a 9-es és 10-es kromoszómákon jelentkező deléciók emelkedett gyakorisága. CGH eredményeink szerint más tanulmányokhoz hasonlóan ezek a kromoszómális szakaszok mind primer mind metasztatikus melanomában frekvenciát eltérések (41, 46). Megfigyeltük, hogy a 9p kromoszóma kar és a 10-es kromoszóma elvesztése gyakran fordult elő együtt a primer tumorokban és metasztázisokban is, ezért úgy gondoljuk, a két DNS szakasz szimultán elvesztése összefügg a tumor iniciációval, a tumor progresszióval és a metasztázisképzéssel is. A CGH-val vizsgált egyik primer tumorban a 10q25-qter szakasz elvesztése volt az egyetlen kimutatható eltérés, ami szintén a 10q kromoszóma kar melanoma iniciációban betöltött szerepére utal. Ez a megfigyelés ugyancsak jó összhangban van más CGH és molekuláris genetikai tanulmányok eredményeivel, ahol a 10q kromoszóma régió terminális szakaszának elvesztését a melanoma keletkezésének korai eseményének tekintik (73). A 9p delécióval kapcsolatban korábban már utaltunk a *CDKN2A* tumor szuppresszor gén melanomában betöltött szerepére, a 10-es kromoszómán a PTEN gén érintettségére pedig több tanulmány felhívta a figyelmet, de emellett más gének szerepe sem kizárt (72).

Vizsgálatunk során lehetőségünk volt arra is, hogy ugyanabból a betegből származó primer tumor és metasztázis párjának CGH analízisét is megvalósítsuk. Ilyen jellegű analízist az irodalomban malignus melanomákra még nem közöltek. Ezzel a megközelítéssel lehetőség adódik azoknak az eltéréseknek a genom szintű felderítésére, melyek segítséget nyújtanak a tumor prognózissal összefüggő genetikai esemény sorozatok tisztázásában. A tanulmányozott tumorpárok egyikében a primer tumorban mindössze egy genetikai eltérést sikerült kimutatni, a primer tumor eltávolítását követően néhány hónap múlva megjelenő metasztázisban viszont a genetikai eltérések halmozódása mutatkozott. A primer tumorban kimutatott 10q15 deléció nem jelent meg a metasztázisban, mely egyértelműen az agresszív viselkedésű klón szelekciós előnyére hívja fel a figyelmet. Ugyanakkor, a többi tumor párban mind a metasztázisban mind a primer tumorban jelenlévő azonos eltérések arra hívják fel a figyelmet, hogy ezek a változások még azelőtt kialakultak mielőtt a metasztatikus szubklón kiszabadult a primer tumorból. Érdekes volt az egyik tumor pár abból a szempontból, hogy a számos CGH-val talált eltérés közül a primer lézióban és metasztázis párjában két eltéréstől eltekintve 11 kromoszómális szakasz eltérése azonos volt, beleértve az 1-es kromoszómán talált dupla amplifikációt is. A csak a metasztázis párban megjelenő eltérés a teljes 3-as kromoszóma

DNS többlete és a 2p21-pter deléciója volt, adataink alapján megállapítható, hogy az előrehaladott malignus melanomák genetikai profilja nagyon heterogén, nemcsak a különböző beteg egyének tekintetében, hanem ugyanazon beteg primer tumora és metasztázisa vonatkozásában is.

A CGH eredmények egyértelműen demonstrálják a kromoszóma aberrációk felhalmozódását a melanoma progressziója során. A metasztázisokban átlagban több eltérés volt, mint a primer tumorban. Az ugyanabból a betegből származó primer tumor-metasztázis pároknál mind a 4 pár esetében a metasztázis több eltérést tartalmazott. A legfigyelemreméltóbb különbség a sebészi kezelés után egy éven belül metasztatizáló primer tumorok és az ezen periódus alatt metasztázist nem képező primer melanomák között volt megfigyelhető, a genetikai eltérések száma statisztikailag szignifikánsan magasabb volt az első csoportban. Eredményeinkből megállapítható, hogy a genetikai aberrációk fokozatos akkumulációja összefügg, illetve arányos a melanoma agresszivitásának növekedésével. A metasztázisban hangsúlyozottabb eltérések valószínűleg a genetikailag heterogén primer tumor sejteinek egy részében már jelen vannak és a metasztikus szóródás irányában szelekciós előnyt biztosítanak.

6.4. Melanoma metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai markerek azonosítása

A melanomás betegek kezelésének eredményesebbé tételéhez elengedhetetlen a metasztázis genetikai kockázatának meghatározása. Ennek vizsgálatára a tumorokat, az előzőekben nem alkalmazott csoportosítását valósítottuk meg Petersen és munkatársai leírásához hasonlóan (80). A két csoportot az áttétet-nem-adó primer tumorok csoportja és a diagnózis időpontjában már metasztázissal rendelkező primer tumorok valamint cután és nyirokcsomó metasztázisok képezték, ez utóbbi csoport a metasztatizáló tumorok csoportja. Ez a megközelítés a tumoros heterogenitás befolyásának csökkentésével megkönnyíti a metasztatikus fenotípus hátterében álló genetikai elérések felismerését (80). Természetesen a gyakori eltérések az előző fejezetben leírt DNS többletekhez/vesztésekhez hasonlóan az 1q, 6p, 7pq, 8q, 9pq és 10q kromoszóma szakaszokon mutatkoztak. A biológiai viselkedésen alapuló csoportosítással megjelenő genetikai különbségek közül statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott, ezért kiemelkedően fontos a 7p és 7q kromoszóma régiók, illetve adott esetben a teljes 7-es

kromoszóma DNS többlete, mely elváltozások a metasztatizáló csoportban lényegesen gyakoribb volt. Megfigyeléseink tökéletes összhangban vannak azzal az elmélettel, mely szerint a 7-es kromoszóma amplifikáció és melanoma agresszív fenotípusa szoros kapcsolatban van, és ez illeszkedik a 7-es kromoszóma-eltérésekhez más tumor típusokban társuló rossz prognózist mutató képbe (35). Megfigyeléseink szerint előrehaladott melanoma tumorokban a 9p és 10q régióban a DNS vesztés előfordulási gyakorisága az áttétet-nem-képző és a metasztatizáló csoportban lényegesen különbözött. A metasztatikus csoportban a két eltérés volt a leggyakoribb a deléciók között, és előfordulási gyakoriságuk statisztikailag közel szignifikáns mértékben meghaladta a nem-áttétképző csoportban megfigyelt értéket. Ugyanakkor a nem-áttétképző csoportban megjelenő DNS vesztések között is gyakori volt a 9p és 10q kromoszómák deléciója, ami azt jelenti, hogy ezek az eltérések már a melanoma korábbi szakaszában kialakulnak, és végig kísérik a progresszió során. Az irodalomban több tumor szuppresszor gént is feltételeznek az adott kromoszómákon, de más-más tumor szuppresszor gén játszik szerepet az iniciációban, illetve a metasztázisképzés folyamatában (41, 65, 72, 73). Puig és munkatársai a 9p kromoszóma szakaszon észlelt nagy kiterjedésű deléciót prognosztikus értékűnek találták a metasztázis kialakulásának előrejelzésében. Vizsgálatukban a 9p kromoszóma szakaszon 8 vagy több mikroszatellita markerrel talált LOH 100% szenzitivitást mutatott a metasztázis előrejelzésében a diagnózistól számított 5 éven belül (81). A 10-es kromoszóma hosszú karján bekövetkező deléciót is kapcsolatba hozzák a metasztatikus hajlammal több tumorban is, pl. fej-nyaki és prosztata daganatban (35).

Érdekesnek és tanulmányozásra érdemesnek tartjuk 7p, 7q régióban mutatkozó amplifikáció és a 10q kromoszóma vesztés együttes előfordulását is, amely statisztikailag szignifikáns mértékben gyakoribb volt a metasztatizáló csoportban. Az együttes előfordulás ugyanis arra enged következtetni, hogy ezek valószínűleg kapcsolt eltérések, s mint ilyenek, a tumoros progresszió egyik útvonalát képviselik.

Bár tanulmányunkban a 9p és 10q kromoszóma karok elvesztése nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés a két csoport között, azonban jelentős különbség volt az említett eltérések előfordulása tekintetében. Mivel a 9p szakaszt Puig és munkatársai érzékeny prognosztikus faktornak találták melanomában, a 10q szakasz kötődése a 7-es kromoszóma amplifikációjához pedig statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a mi analízisünkben, ezért megfontolandó a 9p kromoszómák deléciója mellett a 7-es kromoszóma valamint a 10q kromoszóma régió prognosztikai jelentőségének alapos vizsgálata, e szakaszok eltéréseinek a melanoma prognosztikában genetikai markerként történő alkalmazása. A 3 metasztázis-asszociált genetikai marker együttes alkalmazása javíthat a tumor progresszió előrejelzésében, mivel a tapasztalatok szerint több marker használata hatékonyabb predikciót biztosít (82). Ez

különösen hasznos melanomában, ahol a tumor fejlődése több lehetséges útvonalat követhet (22, 23).

A CGH-val talált metsztázishoz kapcsolódó genetikai markerek vizsgálata FISH-sel alkalmas a primer tumoron belüli szubpopulációk kimutatására, ezáltal a progresszió megítélésére. Éppen ezért elengedhetetlen melanomában a metasztázishoz kapcsolódó kromoszómális eltérések további vizsgálata a progresszióban szerepet játszó onkogének és tumor szuppresszor gének azonosításában, ami kijelöli a jövőbeli kutatási útvonalat.

6.5. Melanoma sejtvonal máj-metasztatizáló képessége összefügg a 4-es kromoszóma, 9p21-pter és 10p kromoszóma szakaszok elvesztésével

Tanulmányunk ezen szakaszában melanoma sejtvonal modellrendszeren kívántuk nyomonkövetni azokat a genetikai eltéréseket, melyek a melanoma máj-metasztázis kialakulásában szerepet játszanak. A melanoma metasztázis modellben a szülői sejtvonalak az A2058 tekinthető, melynek utódsejtvonala a HT168, utóbbinak pedig leszármaztatott vonala a HT168-M1 sejtvonal. A három sejtvonal közül a HT168-M1 máj-metasztázis-képző hajlama messze kiemelkedik a másik kettőhöz viszonyítva, ezért gondoltuk úgy, hogy ez a rendszer alkalmas a metasztázisképzést kísérő genetikai eltérések karakterizálására. A sejtvonalak CGH analízise számos közös eltérést mutatott, de voltak olyan kromoszómális szakaszok, melyek csak az agresszíven metasztatizáló sejtvonalban tűntek fel. A közös eltérésekről feltételezzük, hogy már az eredeti, natív tumorban is jelen voltak és mivel mindhárom sejtvonalban kimutathatók ezek nem járultak hozzá lényegesen a HT168-M1 meg növekedett metasztázis képző hajlamához, természetesen szépen demonstrálják az A2058, a HT168 és a HT168-M1 sejtvonalak között fennálló klonális kapcsolatot.

Ilyen közös eltérés volt a 6-os kromoszóma rövid karjának a DNS többlete, ami a sejtvonalak kialakulásának sorrendjében egyre kiterjedtebb kromoszómális szakaszt foglalt magába. Úgy gondoljuk, a DNS többletnek a sejtvonalak fejlődésével párhuzamosan mutatott egyre nagyobb kromoszómaterületre való kiterjedése az ismételt strukturális átalakulásoknak és újrendeződéseknek, valamint a kromoszóma karon lévő gének egyre nagyobb mértékű amplifikációjának tulajdonítható, ez szelektív növekedési előnyhöz juttathatja a tumor sejteket (41). A többi közös eltérés, mint az 5q, 8q21-qter és 13q, ritkább melanomában, és, bár 8q24-

re lokalizálható C-MYC-en kívül több onkogént is feltételeznek ezekben a régiókban, szerepük nem ismert.

Eredményeink közül azok különösen érdekesek, melyek csak az agresszív metasztatizáló sejtvonalban jelentek meg, ezek a 4-es kromoszóma, a 9p21.3-pter és a 10p DNS szakaszok vesztese volt, jelezve ezen változások kiemelt szerepét a metasztázisképzésben. A 4-es kromoszómavesztés jellegét teljes kromoszómafestő próbával FISH-el tanulmányoztuk tovább. Ezek szerint a sejtek döntő többségében az egyik kromoszóma teljes deléciót mutatott, de kis százalékban jelen volt egy olyan klón is, melyben az egyik rövid kar még jelen volt. A CGH-val megfigyelt 4-es kromoszómavesztését szolid tumorokban is megfigyelték, pl. a hipodiploid mellrákban (13), malignus mesotheliómában (82) és oligodendrogliómában is felfigyeltek rá (83). Shivapurkar és munkatársai. mellrákon végzett vizsgálataik alapján úgy vélték, valószínűleg több lehetséges tumor szuppresszor gén is rejtőzhet ezen a kromoszómán (84).

A 4-es kromoszómavesztés az erősen metasztatikus sejtvonalban a 9p21.3-pter és a 10p vesztéssel társult. Ezeknek a kromoszóma szakaszoknak az alulreprezentált volta malignus melanomában gyakori jelenség. Mindazonáltal, nem lehet kizárni annak a valószínűségét, hogy a közös, vagy a kizárólag a szülő sejtvonalban meglévő genetikai eltérések is érintettek a metasztázisképzés folyamatának bizonyos fázisaiban.

Összességében az alkalmazott melanoma metasztázis-modellben talált kromoszóma elváltozások jó egyezést mutattak a korábbi citogenetikai vizsgálatok megfigyeléseivel. Ugyanakkor eddig kevesebb figyelmet kapott kromoszóma régiók is előtérbe kerültek most a metasztatikus növekedéssel való kapcsolatuk miatt. A 4-es kromoszóma-vesztés megjelenése a fokozottan metasztatikus sejtvonalban a régióban lévő tumor szuppresszor gének inaktivációjának a melanoma agresszív viselkedésének kialakításában játszott szerepére hívta fel a figyelmet.

Napjainkban a daganatdiagnosztikában és terápiában egyre nagyobb szerephez jutnak a molekuláris alapokon nyugvó vizsgálómódszerek, ezért különösen fontos, hogy ismerjük a különböző daganat típusok genetikai profilját. A molekuláris markerek azonosításával sokkal precízebb és objektívebb kritériumok figyelembe vételére nyílik mód, ami megbízhatóbbá teszi a differenciál diagnózist és a prognózist. Annak ellenére, hogy CGH-val egyedi gének nem vizsgálhatók, a CGH módszer haszna a tumorok teljes genomra kiterjedő gyors és átfogó genetikai analízisében kétségtelen. Dolgozatomban ennek az irányvonalnak megfelelően igyekeztem malignus melanomában is demonstrálni a CGH és FISH módszer jelentőségét a melanomára specifikus genetikai biomarkerek kimutatásában. Tanulmányunk primer és metasztatikus malignus melanomára az első részletes, teljes genomot átfogó vizsgálat a tumor

progressziójában megjelenő DNS kópiaszám változások gyakoriságának és elhelyezkedésének leírására. A vizsgálat során sikerült metasztázis-specifikus markert találnunk, ami segítséget nyújthat a klinikusnak és a patológusnak a döntéshozatalban. A CGH-val melanomában kimutatott összetett genetikai elváltozások azt jelzik, hogy a tumor malignus potenciáljának elbírálásához nagyszámú gént kell tekintetbe venni, amelyek felfedezése és szerepük leírása a további kutatások nagy kihívása.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

1. A betegekből származó melanoma szövetmintákon és sejtvonalakon végzett kísérleteink során alkalmazott CGH és FISH érzékeny és hatékony módszernek bizonyult a melanoma kromoszómális eltéréseinek kimutatásában.
2. Primer melanomán és metasztázisán interfázisos FISH módszerrel bizonyítottuk, hogy a kromoszómális deléciók nemcsak a tumor progresszióban, de a tumor iniciációjában is szerepet játszanak.
3. Megállapítottuk, hogy a genetikai aberrációk fokozatos akkumulációja együtt jár a melanoma agresszivitásának növekedésével. CGH adataink alapján a genetikailag heterogén primer tumor számos sejtpopulációja között a klonális szelekció eredményeként megjelenik a metasztatikus sejtklón.
4. A 7-es kromoszóma többlete a malignus melanomában rossz prognózissal társul, eredményeink szerint aneuploidiaja vagy a kromoszómán lokalizálódó gének amplifikációja kapcsolatban állhat a fokozott metasztázisképző potenciállal.
5. Az agresszív, máj-metasztázist képző sejtvonalban a metasztázisképző hajlamhoz társuló genetikai eltérések közül eddig ismeretlen 4-es kromoszóma deléciója újabb fontos, az áttétképzéssel összefüggésbe hozható onko-szuppresszor gének jelenlétére hívhatja fel a figyelmet.
6. Megállapítottuk, hogy a 9-es és 10-es kromoszóma vagy ezeknek a kromoszómáknak bizonyos szakaszai a metasztatikus progresszió korai fázisában deletálódnak és ezek a genetikai eltérések a távoli metasztázisok kialakulásában is szerepet játszanak. A 6p és a 8q szakaszok amplifikációja későbbi eltérések és elsősorban a tumor növekedésében és az invázióban játszanak szerepet, a 7-es kromoszóma aberráció a metasztázis megjelenéséhez, a 4-es kromoszóma elvesztése pedig a távoli máj-metasztázis kialakulásához köthető. Ezeknek a kromoszómáknak az aberrációi így egy progressziós sort képviselnek.

7. Saját és az irodalomban megjelent tanulmányok alapján a 7-es kromoszóma többlet és a 9p és 10q kromoszóma karok vesztese a metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai markereknek tekinthetők.

8. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALM	Acralis lentigo melanoma
ANOVA	Variancia analízis
CDKN2A	Ciklin dependens kináz 2A gén
CGH	Komparatív genomiális hibridizáció
C-MYC	Celluláris myc onkogén
DAPI	Diamino-fenilindol
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
d-UTP	Dezoxi-uridin-trifoszfát
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
EGFR	Epidermális növekedési faktor
FCM	Áramlási citometria
FISH	Fluoreszcencia in situ hibridizáció
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
LMM	Lentigo maligna melanoma
LOH	Heterozigótaság elvesztése
MM	Malignus melanoma
NMM	Nodularis malignus melanoma
OCT	Orto-krezil-toluol
PBS	Foszfát pufferoldat
PCI	Fenol:kloroform:izoamilalkohol keverék
PI	Propidium-jodid
RGP	Radiális növekedési fázis
RNAse	Ribonukleáz enzim
RT-PCR	Reverz-transzkripción alapú polimeráz láncreakció
SSM	Superficialis malignus melanoma
TRITC	Tetra-rodamin-izotiocianát
VGP	Vertikális növekedési fázis

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Welch D.R., Goldberg S.F. (1997): Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. *Pathobiol*; 65:311-30.
2. Schneider I. (1999): A melanoma klinikumának és szövettanának változásai. *Dermatológiai Referáló Szemle*, Június; p9-10.
3. Barth A., Wanek L.A., Morton D.L. (1995): Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*; 181:193-201.
4. Eggermont A.M. (2000): Adjuvant therapy of malignant melanoma and the role of sentinel node mapping. *Recent Res Cancer Res*; 157:178-89.
5. Lapis K. (1989): *Patológia. Medicina*, Budapest, p382-388.
6. Marghoob A.A., Koenig K., Bittencourt F.V., Kopf A.W., Bart R.S. (2000): Breslow thickness and Clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Support Joint Committee on Cancer Staging. *Cancer*, 88(3):589-95.
7. Blaheta H.J., Ellwanger U., Schittek B., Sotlar K., MacZey E., Breuninger H., Thelen M.H., Bueltmann B., Rassner G., Garbe C. (2000): Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 114(4):637-42.
8. Lee S.M., Betticher D.C., Thatcher N. (1995): Melanoma: chemotherapy. *Br Med Bull*, 51:609-30.
9. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396:643-649.
10. Loeb K.R., Loeb L.A. (2000): Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):379-85.
11. Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggind G.J., Willson J.K.V., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1998): Mutation of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*; 392:300-3.
12. Duesberg P., Rasnick D., Li R., Winters L., Rausch C., Hehlmann R. (1999): How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res*; 19:4887-4906.
13. Tanner M.M., Karhu R.A., Nupponen N.N., Borg A., Baldetorp B., Pejovic T., Ferno M., Killander D., Isola J.J. (1998): Genetic alterations in hypodiploid breast cancer. Frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 oncogene. *Am J Pathol*; 153:191-9.
14. Morita R., Fujimoto A., Naohito H., Takehara K., Takata M. (1998): Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals genetic alterations and clonal evolution during progression. *J Invest Dermatol*; 111:919-24.

15. Fuji H., Marsh C., Cairns P., Sidransky D., Gabrielson E. Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer. Res.* 56: 1493-1497, 1996.
16. Tollenaar R. A., Bonsing B. A., Kuipers-Dijkshoorn N. J., Hermans J., Van de Velde C. J., Cornelisse C. J., Fleuren G. J., Evidence of clonal divergence in colorectal carcinoma. *Cancer* 79: 1304-1314, 1997.
17. Fearon E. R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767,1990.
18. Loeb L.A., Christians F.C. (1996): Multiple mutations in human cancer. *Mutat Res*; 350:279-286.
19. Catellano M., Parmiani G. (1999): Genes involved in melanoma: an overview of INK4a and other loci. *Melanoma Res*; 9(5):421-32.
20. Thompson F.H., Emerson J., Olson S., Weinstein R., Leavitt S.A., Leong S.P., Emerson S., Trent J.M., Nelson M.A., Salmon S.E., et al. (1995): Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma. Subset analysis of near-diploid and simple karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet*; 83(2):93-104.
21. Mertens F., Johansson B., Hoglund M., Mitelman F. (1997): Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res*; 57(13):2765-80.
22. Hoglund M., Gisselsson D., Mandahl N., Johansson B., Mertens F., Mitelman F., Sall T. (2001): Multivariate analysis of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer*; 31(2):156-71.
23. Rübben A., Babilas P., Baron J.M., Hofheinz A., Neis M., Sels F., Sporkert M. (2000): Analysis of tumor cell evolution in a melanoma: Evidence of mutational and selective pressure for loss of p16INK4 and for microsatellite instability. *J Invest Dermatol*; 114:14-20.
24. Dracopoli N.C., Fountain J.W. (1996): CDKN2 mutations in melanoma. *Cancer Surv*; 26:115-32.
25. Walker G.J., Palmer J.M., Walters M.K., Hayward N.K. (1995): A genetic model of melanoma tumorigenesis based on allelic losses. *Genes Chromosomes Cancer*; 12:134-41.
26. Saida T. (2001): Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci*; 26(1):1-13.
27. Talve L., Sauroja I., Collan Y., Punnonen K., Ekfors T. (1997): Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer*; 74:255-259.
28. Parris C.N., Harris J.D., Griffin D.K., Cuthbert A.P., Silver A.J., Newbold R.F. (1999): Functional evidence of novel tumor suppressor genes for cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res*; 59:516-20.

29. Tsao H., Zhang X., Benoit E., Haluska F.G. (1998): Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene*; 16(26):3397-402.
30. Reinfenberger J., Wolter M., Bostrom J., Buschges R., Schulte K.W., Megahed M., Ruzicka T., Reifemberger G. (2000): Allelic losses on chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumour suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas. *Virchows Arch*; 436(5):487-93.
31. Ray M.E., Su Y.A., Meltzer P.S., Trent J.M. (1996): Isolation and characterization of genes associated with chromosome-6 mediated tumor suppression in human malignant melanoma. *Oncogene*; 12:2527-2533.
32. Mertens F., Johansson B., Mitelman F. (1994): Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer*; 10:221-230.
33. Koprowski H., Herlyn M., Balaban G., Parmiter A., Ross A., Nowell P. (1985): Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. *Somat Cell Mol Genet*; 11:297-302.
34. Sparrow L.E., Heenan P.J. (1999): Differential expression of epidermal growth factor receptor in melanocytic tumours demonstrated by immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Australas J Dermatol*; 40(1):19-24.
35. Alers J.C., Rochat J., Krijtenburg P.J., Hop W.C.J., Kranse R., Rosenberg C., Tanke H.J., Schröder F.H., Van Dekken H. (2000): Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest*; 80(6):931-42.
36. Kraehn G.M., Utikal J., Udart M., Greulich K.M., Bezold G., Kaskel P., Leiter U., Peter R.U. (2001): Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. *Br J Cancer*; 84(1):72-9.
37. Grover R.N., Ross D.A., Richman P.I., Robinson B., Wilson G.D. (1996): C-myc oncogene expression in human malignant melanoma and its relationship with tumor antigenicity. *Eur J Surg Oncol*; 22:342-346.
38. Poetsch M., Woenckhaus C., Dittberner T., Pamber M., Lorenz G., Herrmann F.H. (1998): An increased frequency of numerical chromosomal abnormalities and 1p36 deletions in isolated cells from paraffin sections of malignant melanomas by means of interphase cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet*; 104:146-52.
39. Poetsch M., Dittberner T., Cowell J.K., Woenckhaus C. (2000): TTC4, a novel candidate tumor suppressor gene at 1p31 is often mutated in malignant melanoma of the skin. *Oncogene*; 19(50):5817-20.
40. Barks J.H., Thompson F.H., Taetle R., Yang J.M., Stone J.F., Wymer J.A., Khavari R., Guan X.Y., Trent J.M., Pinkel D., Nelson M.A. (1997): Increased chromosome 20 copy number detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*; 19:278-85.

41. Bastian B.C., LeBoit P.E., Hamm H., Brocker E.B., Pinkel D. (1998): Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*; 58:1270-5.
42. Knuutila S., Bjorquist A.M., Autio K., Tarkkanen M., Wolf M., Monni O., Szymanska J., Larramendy M.L., Tapper J., Pere H., El-Rifai W., Hemmer S., Wasenius V.M., Vidgren V., Zhu Y. (1998): DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol*; 152:1107-23.
43. Knuutila S., Aalto Y., Autio K., Bjorquist A.M., El-Rifai W., Hemmer S., Huhta T., Kettunen E., Kiuru-Kuhlefelt S., Larramendy M.L., Lushnikova T., Monni O., Pere H., Tapper J., Tarkkanen M., Varis A., Wasenius V.M., Wolf M., Zhu Y. (2000): DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol*; 155(3):683-94.
44. Waldman F.M., Sauter G., Sudar D., Thompson C.T. (1996): Molecular cytometry of cancer. *Hum Pathol*; 27:441-449.
45. Wiltshire R.N., Duray P., Bittner M.L., Visakorpi T., Meltzer P.S., Tuthill R.J., Liotta L.A., Trent J.M. (1995): Direct visualization of the clonal progression of primary cutaneous melanoma application of tissue microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Res*; 55:3954-7.
46. Bastian B.C., Kashani-Sabet M., Hamm H., Godfrey T., Moore D.H. (2000): Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res*; 60(7):1968-73.
47. Sambrock J., Fritsch E.F., Maniatis T.: Molecular cloning. in A laboratory manual, 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA
48. Todaro J., Fryling C., DeLarco J.E. (1980): Transforming growth factors produced by certain human tumour cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci*; 77(6):5258-62.
49. Timar J., Kovalszky I., Paku S., Lapis K., Kopper L. (1989): Two human melanoma xenografts with different metastatic capacity and glycosaminoglycan pattern. *J Cancer Res Clin Oncol*; 115:554-7.
50. Ladanyi A., Timar J., Paku S. et al. (1990): Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int J Cancer*; 46(3):456-61.
51. Herlyn M. (1990): Human melanoma: development and progression. *Cancer Metastasis Rev*; 9:101-12.
52. Tsuchida T., Saxton R.E., Irie R.F. (1987): Gangliosidosis of human melanoma: GM2 and tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst*; 78:55-9.
53. Mueller B.M., Romerdahl C.A., Trent J.M., Reisfeld R.A. (1991): Suppression of spontaneous melanoma metastasis in SCID mice with an antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res*; 51:2193-8.

54. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular analysis of solid tumors. *Science*; 258:818-21.
55. Balazs M., Mayall B.H., Pinkel D., Gray J.W., Waldman F.M. (1995): Karyotypic heterogeneity and its relation to labeling index in interphase breast tumor cells. *Cytometry*; 20:62-74.
56. Balazs M., Mayall B.H., Waldman F.M. (1991): Interphase cytogenetics of a male breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*; 55:243-7.
57. Balazs M., Mayall B.H., Waldman F.M. (1991): Simultaneous analysis of chromosomal aneusomy and 5-bromodeoxyuridine incorporation in MCF-7 breast tumor cell line. *Cancer Genet Cytogenet*; 57:93-102.
58. Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C., Russel G., Goodwin D., Holborrow E.L. (1989): Fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods*; 55:231-42.
59. Dhingra K, Sneige N., Pandita T. K., Johnston D. A., Lee J. S., Emami K., Hortobagyi G. N., Hittelman W. N. (1994): Quantitative analysis of chromosome in situ hybridization signal in paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry*; 16(2): 100-12.
60. Poetsch M., Dittberner T., Woenckhaus C., Kleist B. (2000): Use of cytogenetics in demonstrating specific chromosomal aberrations in solid tumors – new insight in the pathogenesis of malignant melanoma and head and neck squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*; 15(4):1225-31.
61. De Wit P.E., Moretti S., Koenders P.G., Weterman M.A., Van Muijen G.N., Gianotti B., Ruiter D.J. (1992): Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *J Invest Dermatol*; 99:168-73.
62. De Wit P.E., Hopman A.H.N., Van Muijen G.N.P., Smeets D.F.C.M., Beck J.L.M., Moesker O., Ruiter D.J. (1992): In situ detection of supernumerary aberrations of chromosome-specific repetitive DNA targets in interphase nuclei in human melanoma cell lines and tissue sections. *J Invest Dermatol*; 98:450-8.
63. Wang Z.H., Ding M.X., Jin M.L., Cheng-Chew S.B., Yun J.P., Wu B.Q., Chew E.C. (1999): Association of EGFR gene fragments with nuclear matrix proteins in high and low metastatic melanoma cell lines. *Anticancer Res*; 19:4349-52.
64. Herbst R.A., Podewski E.K., Mommert S., Kapp A., Weiss J. (1999): PTEN and MXII allelic loss on chromosome 10q is rare in melanoma in vivo. *Arch Dermatol Res*; 291(10):567-9.
65. Robertson G.P., Herbst R.A., Nagane M., Huang H.J., Cavenee W.K. (1999): The chromosome 10 monosomy common in human melanomas results from loss of two separate tumor suppressor loci. *Cancer Res*; 59(15):3596-601.

66. Balaban G.B., Herlyn M., Clark W.M., Jr, Nowell P.C. (1986): Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 83: 93-104.
67. Kath R., Rodeck U., Menssen H.D., Mancianti M.L., Linnenbach A.J., Elder D.E., Herlyn M. (1989): Tumor progression in the human melanocytic system. *Anticancer Res* 9: 865-872.
68. Atkin N. B., Baker M. C., A metastatic melanoma with 24 chromosomes. *Hum. Genet.*, 58: 217-219, 1981.
69. Berger R. (1968): Sur la methodologie de l'analyse des chromosomes. Thesis, Faculte des Sciences, Párizs.
70. Shackney S.E., Smith C.A., Miller B.W., Burholt D.R., Murtha K., Gilles H.R., Ketterer D.M., Pollice A.A. (1989): Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res*; 49:3344-54.
71. Burholt D.R., Shackney S.E., Ketterer D.M., Pollice A.A., Smith C.A., Brown K.A., Gilles H.R., Schepart B.S., (1989): Karyotypic evolution of human undifferentiated large cell carcinoma of the lung in tissue culture. *Cancer Res*; 49:3355-61.
72. Pollock P.M., Welch J., Hayward N.K. (2001): Evidence for three tumor suppressor loci on chromosome 9p involved in melanoma development. *Cancer Res*; 61(3):1154-61.
73. Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshuman K., Tavtigian S.V., Stockert E., Day R.S., Johnson B.E., Skolnick M.H. (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*; 264:436-40.
74. Kraehn G.M., Scharl M., Peter R.U. (1995): Human malignant melanoma: a genetic disease? *Cancer*; 12:134-41.
75. Trent J.M. (1991): Cytogenetics of human malignant melanoma. *Cancer Metast Rev*; 10:103-13.
76. Elfving P., Cigudosa J.C., Lundgren R., Limon J., Mandahl N., Kristofferson U., Heim S., Mitelman F. (1990): Trisomy 7, trisomy 10, and loss of the Y chromosome in short-term cultures of normal kidney tissue. *Cytogenet Cell Genet*; 53:123-5.
77. Mertens F., Johansson B., Mitelman F. (1994): Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer*; 10:221-230.
78. Greulich K.M., Utikal J., Peter R.U., Kraehn G. (2000): C-MYC and nodular malignant melanoma. A case report. *Cancer*; 89:97-103.
79. Trent J.M., Meyskens F.L., Salmon S.E., Ryschmon K., Leong S.P.L., Davis J.R., McGee D.L. (1990): Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. *N Engl J Med*; 322:1508-11.
80. Petersen S., Aninat-Meyer M., Schlüns K., Gellert K., Dietel M., Petersen I. (2000): Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer*; 82 (1):65-73.

81. Puig S., Castro J., Ventura P.J., Ruiz A., Ascaso C., Malveyh J., Estivill X., Mascaro J.M., Lecha M., Castel T. (2000): Large deletions of chromosome 9p in cutaneous malignant melanoma identify patients with a high risk of developing metastases. Hospital Clinic Malignant Melanoma Group, University of Barcelona. *Melanoma Res*; 10(3):231-6.
82. Schneider P.M., Praeuer H.W., Stoeltzing O., Boehm J., Manning J., Metzger R., Fink U., Wegerer S., Hoelscher A.H., Roth J.A. (2000): Multiple molecular marker testing (p53, C-Ki-ras, c-erbB-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*; 83(4):473-9.
83. Bjorquist A.M., Tammilehto L., Anttila S. et al. (1997): Recurrent DNA copy number changes in 1q, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q and 22q detected by comparative genomic hybridization in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*; 75(4):523-7.
84. Bigner S.H., Matthews M.R., Rasheed B.K. et al. (1999): Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*; 155(2):375-86.

10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények

Balázs M., **Ádám Z.**, Bégány A., Takruri A. T., Ádány R. (1999): Involvement of chromosome losses in the progression and metastasis formation of a human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*; 109 (2):114-8.

IF: 1,759

Ádám Z., Ádány R., LÁdányi A., Timar J., Balázs M. (2001) Liver metastatic ability of human melanoma cell line is associated with losses of chromosome 4, 9p21-pter and 10. *Clin Exp Metastasis*; 18(4):295-302.

IF: 2,000

Balázs M., **Ádám Z.**, Bégány A., Hunyadi J., Ádány R. (2001): Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization. *Cytometry*; 46(4):222-32.

IF: 2.843

10.2. Egyéb közlemények

Nagy M., Balázs M., **Ádám Z.**, Petko Z., Timar B., Szereday Z., Laszlo T., Warnke R. A., Matolcsy A. (2000): Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia*; 14(12):2142-8.

IF: 3,562

10.3. Előadások és poszterek

Ádám Zs. (1996): A genotípus és a metasztatizáló képesség összefüggésének vizsgálata melanoma sejtvonalakon. A Debreceni Orvostudományi Egyetem Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen

Balázs M., Bégány A., Hunyadi J., **Ádám Z.**, Ádány R. (1996): Detection of chromosome aneuploidy in interphase cells from primary human melanoma using FISH. The 18th Congress of the International Society for Analytical Cytology. Rimini, Italy. *Cytometry Suppl.* 8. TB34. p59.

Balázs M., **Ádám Zs.**, Tímár J., Ádány R. (1996): A genotípus és a különböző metasztatizáló készség közötti összefüggések vizsgálata FISH és CGH módszerekkel. Magyar Labordiagnosztikai Társaság 46. Nagygyűlése, Miskolc

Balázs M., **Ádám Zs.**, Takruri A., Ádány R. (1997): Kromoszóma és genomiális szintű alterációk feltérképezése malignus melanoma sejtvonalakon. V. Fejlődésbiológiai napok, Debrecen, Január 19-22. p21.

Ádám Zs. (1997): A genotípus és fenotípus közötti összefüggések tanulmányozása humán melanoma sejtvonalakon komparatív genomiális hibridizációval. A Debreceni Orvostudományi Egyetem Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen

Balázs M., **Ádám Zs.**, Ádány R. (1997): Malignus melanomák genetikai instabilitása és metasztatizáló képessége közötti összefüggések tanulmányozása molekuláris genetikai módszerekkel. Magyar Onkológusok Társaságának XXII. Nemzetközi Kongresszusa, Budapest, November 10-12.

Ádám Zs. (1998): Malignus melanomák és melanoma metasztázisok genetikai instabilitásának jellemzése komparatív genomiális hibridizációval. A Debreceni Orvostudományi Egyetem Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen

Balázs M., **Ádám Z.**, Bégány A., Hunyadi J., Ádány R. (1998): Genomic instability of melanoma cell lines and human malignant melanomas detected by CGH. 19th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, in Cooperation with the Center for Continuing Education at Tulan University Medical Center, New Orleans, LA, USA

Balázs M., **Ádám Zs.**, Ádány R. (1998): Tumorok kialakulását és progresszióját kísérő genetikai elváltozások kimutatása molekuláris genetikai módszerekkel. Népegészségügyi Tudományos Társaság VII. Nagygyűlése, Pécs, Április 23-25.

Ádám Zs., Balázs M., Ádány R. (1998): Malignus melanomák genetikai karakterizálása komparatív genomiális hibridizációval. I. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, Május 28-30.

Balázs M., **Ádám Zs.**, Ádány R. (1998): Fluoreszcencia in situ hibridizáció a sejtanalitikai kutatásban és alkalmazási lehetőségek. I. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, Május 28-30.

Ádány R., **Petko Z.**, Ádám Z., Balázs M., Juhasz A., Repassy G., Balázs M. (1998): Genetic alterations detected by comparative genomic hybridization (CGH) in laryngeal and hypopharyngeal cancers. 17th UICC International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brazília

Balázs M., **Ádám Zs.**, Bégány A., Hunyadi J., Ádány R. (1998): Malignus melanomák progressziójának molekuláris markerei. Magyar Labordiagnosztikai Társaság 48. Nagygyűlése, Kecskemét, Szeptember 2-5.

Ádány R., Petko Z., **Ádám Z.**, Balázs M., Juhasz A., Repassy G. Balázs M. (1998): Genetic alterations detected by comparative genomic hybridization (CGH) in laryngeal and hypopharyngeal cancers. The 4th International Congress on Cancer, Gerontology and Ecology, Beijing, Kína

Ádám Z., Balázs M., Bégány A., Hunyadi J., Ádány R. (1998): Chromosomal changes detected by comparative genomic hybridization in advanced stage malignant melanoma. 11th Heidelberg Cytometry Symposium, Németország

Ádám Z., Ádány R., Bégány A., Hunyadi J., Balázs M. (1999): Pattern of chromosomal alterations in primary and metastatic tumors. Future Trends in Quantitative Cytology, an ISAC sponsored International Conference, Hortobágy