

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) TÉZISEK

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) TÉZISEK

Melanoma progresszióval összefüggő genetikai és génexpressziós változások

Rákosy Zsuzsa

Témavezető:

Dr. Balázs Margit
tanszékvezető egyetemi tanár

Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum
Népegészségügyi Kar Megelőző Orvostani Intézet
MTA Népegészségügyi Kutató Csoport

2008

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Prof. Dr. Balázs Margit tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy szakmai tanácsaival munkámat irányította, és Ph.D munkám elkészítését segítette.

Külön köszönetet mondok Prof. Dr. Ádány Róza intézetvezető egyetemi tanárnak, hogy a Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum Népegészségügyi Kar, Megelőző Orvostani Intézetében dolgozhattam.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Bégány Ágnesnek, Ecsedi Szilviának, Vízkeleti Laurának valamint az intézet valamennyi dolgozójának a munkám során nyújtott segítségükért.

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	5
Irodalmi Áttekintés.....	7
A humán malignus melanoma.....	7
A melanoma etiológiája és rizikó faktorai.....	8
A melanoma klinikai altípusai.....	9
A melanoma TNM-klasszifikációja.....	9
Malignus melanoma genetikai eltérései.....	11
In situ hibridizációs módszerek szerepe a melanoma kutatásban.....	12
Célkitűzések.....	17
Anyagok és módszerek.....	18
Melanoma szövetminták FISH analízisekhez.....	18
Melanoma sejtvonalak, sejttenyésztés.....	21
Normál limfociták preparálása.....	21
DNS próbák.....	22
A fluoreszcencia in situ hibridizáció.....	22
EGFR gén és a 9p21 lokusz kópiaszám eltéréseinek elemzése.....	23
FISH eredmények statisztikai analízise.....	23
Microarray alapú génexpressziós analízis.....	24
Microarray adatok statisztikai elemzése.....	24
Jelátviteli útvonal analízis.....	25
Taqman Low Density Array (TLDA).....	25
Array-CGH (aCGH).....	26
EGFR mutáció analízis.....	27
Immunhisztokémia.....	28
Áramlási citometria.....	29
Western blot analízis és immunprecipitáció.....	29
Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mérések.....	30
Eredmények.....	31
Malignus melanomák génexpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával.....	31
Melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő génexpressziós változások.....	33
A gének funkcionális analízise.....	37
Array CGH adatok és a génexpressziós változások.....	42
Taqman Low Density Array (TLDA) analízis.....	45
EGFR és 7-es kromoszóma eltéréseinek vizsgálata primer malignus melanomákban.....	47
9p21 lokusz és a 9-es kromoszóma kópiaszám eltérései primer malignus melanomában.....	54
Megbeszélés.....	58
Összefoglalás.....	69
Közlemények jegyzéke.....	71
Irodalomjegyzék.....	77
Függelékek.....	83

Bevezetés

Az élő szervezetet felépítő sejteket, a sejtek genetikai állományát számos károsodás érheti. A gének szerkezeti és funkcionális változásai legtöbbször kóros következményekkel járnak. Ezen génhibák a szabályozás zavarain keresztül – egyéb betegségek mellett – daganatok keletkezéséhez vezethetnek. Ma már széleskörbe elfogadott, hogy daganatok genetikai betegségek, kialakulásukban örökletes és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak, legjellemzőbb tulajdonságuk a folyamatos de nem feltétlenül egyenletes ütemű növekedés. A szabályozatlan sejtproliferáció a sejtkéletkezés és –pusztulás homeosztázisának felborulásából fakad, melyet a proliferáció, génexpresszió, DNS-javító, valamint a sejt-sejt, sejt-mátrix kölcsönhatásában kulcsszerepet játszó gének hibái eredményeznek. A daganatos megbetegedések az utóbbi évtizedekben világszerte népbetegséggé váltak, és annak ellenére, hogy néhány daganat esetében rendelkezésünkre áll hatékony terápia (pl: emlődaganat, Herceptin terápia) többségükkel szemben az orvostudomány jelenleg tehetetlen. Ennek egyik oka a már forgalomban lévő kemoterápiás szerek ellen kialakuló tumorrezisztencia, valamint az, hogy a tumorok nagyrésznél még nincsenek azonosítva azok a tumorigenezis háttérben álló konkrét molekuláris elváltozások, melyek hatékony terápiás célpontként funkcionálhatnának. Különösen igaz ez a bőr festéksjtjeinek rosszindulatú daganatára, a melanomára. A melanomagenézisben szerepet játszó eltérések karakterizálását megnehezíti, hogy a daganat kialakulása számos alternatív útvonalon lehetséges, különböző jelátviteli folyamatok zavarát okozva, megnehezíti a daganat progresszióban meghatározó szerepet játszó agresszív sejtklonok azonosítását a genetikai eltérések intratumorális heterogenitása is.

A melanoma incidenciája világszerte, így hazánkban is, szinte évről évre növekszik és sajnos egyre fiatalabb korosztályokat érint. Magyarországon az utóbbi időben is évente kb. 300 ember halt meg áttétes melanomában. A malignus melanoma jelenlegi kezelése a daganat sebészi eltávolítása. Ugyanakkor a festéksjtjes rosszindulatú daganat korai felismerésével és az időben elvégzett korrekt sebészeti kezelés ellenére is a betegek csak kis százaléka gyógyítható eredményesen. Ezen adatok feltétlenül indokolják, hogy felhívjuk a figyelmet a „melanomakérdés” fontosságára és aktualitására, hiszen kialakulásának invazivitásának és a gyors metasztatizáló képességének háttérben álló molekuláris biológiai folyamatok az intenzív kutatások ellenére még ma is tisztázatlanok.

Az elmúlt évtizedben tért hódított microarray technikákkal lehetővé vált a tumor genom genetikai eltéréseinek és a gének expressziós mintázatának átfogó analízise, új, eddig ismeretlen betegség specifikus genetikai alterációk azonosítása. Jelentőségük elsősorban

abban rejlik, hogy alkalmazásukkal a tumor genom eltérései, és az összes ismert transzkriptomra vonatkozó gyors és átfogó molekuláris analízise valósítható meg. A módszerrel egyetlen kísérlet során genetikai, illetve génexpressziós elváltozások sorozata határozható meg. Ezek az eltérések azokra a kromoszómális régiókra, génekre hívják fel a figyelmet, melyek eltérései specifikusak lehetnek egy adott daganat típusra, továbbá a tumor progresszió meghatározott stádiumára. Ezekkel a technikákkal nyert információk már több tumornál diagnosztikai és prognosztikai értékűek.

A nagyfelbontású módszerek mellett kiemelkedő jelentőségű a daganatspecifikus eltérések azonosításában a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) technika, mellyel az interfázisos sejtekben a kromoszómák szinte valamennyi eltérése (aneuploidia, transzlokáció, gén amplifikáció és deléció) kimutatható, és az eltérések daganaton belüli heterogenitása is tanulmányozható.

Doktori disszertációmban a FISH és a microarray módszerek módszertani megközelítéseit alkalmazva célom volt a humán malignus melanoma genetikai és génexpressziós eltéréseinek analízise. Interfázisos FISH vizsgálattal az EGFR onkogén és a 9p21-es tumorszuppresszor lokusz számbeli eltéréseinek meghatározása egyedi sejtek szintjén, az alterációk klinikopatológiai paraméterekkel történő korrelációs analízise. Primer és melanoma metasztázisok génexpressziós mintázatának elemzése microarray technikával, valamint a génexpressziós változások és a tumorgenom genetikai eltérései közötti összefüggés vizsgálata.

Irodalmi áttekintés

A humán malignus melanoma

A melanoma malignum a bőrdaganatok mintegy 20%-át kitevő, a bőr bazális rétegében elhelyezkedő festékes sejtekből, a melanocitákból, egyes esetekben pedig valamelyik festékes anyajegy (naevus) területéről kiinduló rosszindulatú daganatos elváltozás^{1,2}. A daganat agresszív viselkedésén kívül igen heterogén biológiai tulajdonságáról ismert. Az egyénre vonatkoztatott kórjóslat értéke a folyamatosan bővülő ismeretek ellenére még napjainkban is alacsony. A neoplasztikus melanociták az esetek többségében megtartják pigment termelő tulajdonságukat, így a melanomák többsége barnás színeződésű lézió formájában jelentkezik. Előfordulhat azonban az is, hogy a transzformáció során elveszítik festékképző képességüket³.

A daganat kialakulása során az alábbi öt, morfológiailag és biológiaiul jól elkülönülő fázis különböztethető meg: 1.) születéskor már meglévő vagy később kialakult szabályos (típusos) szerkezetű naevus, 2.) morfológiailag atípiát mutató ún. diszplasztikus naevus, 3.) radiális-növekedési irányú (*radial growth phase: RGP*), 4.) vertikális-növekedési irányú (*vertical growth phase: VGP*), 5.) metasztatikus melanoma. A *de novo* melanoma kialakulásának első lépésére a keratinocita-melanocita-egység megbomlása jellemző, ami a melanociták keratinocitákhoz viszonyított arányának megnövekedését vonja maga után. Ezt követi a melanociták hiperpláziája, majd a sejtek diszpláziája és kialakulhatnak az ún. prekursor léziók, melyek közvetlenül az *in situ* melanoma megjelenéséhez vezetnek. Az *in situ* melanomák, melyek a radiális növekedési fázisnak felelnek meg, elsősorban lap szerint, az epidermiszen belül növekednek. A daganat vertikális irányú növekedése során a melanoma sejtek a bazális membránt áttörve behatolnak a dermiszbe és a bőralatti zsírszövetbe. Feltételezések szerint a melanoma metasztatikus potenciáljának és agresszív viselkedésének kialakulásában a radiális-fázis – vertikális-fázis közötti átmenet a döntő lépés. Ennek megfelelően a primer melanoma vastagsága sokáig a prognózis felállításának egyik legfontosabb paramétere volt^{4, 5}. Míg a radiális növekedési fázisban lévő melanomasejtek viselkedését a környező sejtek exogén növekedési faktorai befolyásolják és jellemzőjük, hogy immundeficiens egerekben nem képeznek daganatot⁶, addig a vertikális növekedési fázisú melanomasejtek szinte teljesen függetlenednek a környező keratinocitáktól, fibroblasztoktól, növekedési-faktor- és kihorgonyzás-független (anchor-független) növekedésre tesznek szert,

immunhiányos egerekben tumor kialakulását idézik elő, továbbá mind betegekből, mind kísérleti állatmodellekben nagyfokú metasztatizáló hajlammal rendelkeznek⁷.

A melanoma etiológiája és rizikó faktorai

A melanoma incidenciája az elmúlt évtizedekben világszerte folyamatosan növekedett. A növekedési ráta populációnként, korcsoportonként és földrajzi elhelyezkedés alapján eltérő, de évente átlagosan 4% a világos bőrű populációkat tekintve^{3, 8-12}. Az elmúlt évek intenzív kutatásainak eredményeként számos, a melanoma kialakulásában fontos szerepet játszó etiológiai tényező került napvilágra. Az akut napsugárzásnak, különösen a gyermekkorban elszenvedett többszöri, amely szoros korrelációban áll az egyén bőrszínével meghatározó szerepe van^{8, 13, 14}. A nap ultraibolya-sugárzása, elsősorban annak rövidebb hullámhosszú ultraibolya B (UVB, 280-320 nm) komponense, emellett kisebb mértékben az ultraibolya A (UVA, 320-400 nm) sugárzás tehető leginkább felelőssé a betegség létrejöttében^{9, 15}. A fokozott napsugárzás hatására génekárosodás alakulhat ki a bőr sejtjeiben, amelyet a sejt DNS-hibajavító rendszere legtöbbször kijavít. Amennyiben a DNS hibajavítás nem működik tökéletesen, olyan génhibák jönnek létre, melyek halmozódása révén daganat kialakulását eredményezheti. A tartós naphatásnál sokkal veszélyesebb a napégés okozta károsodás. A statisztika szerint, ha az élet során elszenvedett napégések száma meghaladja az ötöt, a festékes daganat előfordulási gyakorisága lényegesen megemelkedik. Az UV sugárzás azonban nem csak természetes forrásból származhat. A napjainkban oly divatos szolárium mesterséges UV forrást jelent, azonban eddig nem sikerült egyértelmű bizonyítékot felmutatni a melanoma kialakulásában betöltött szerepére vonatkozóan.

További fontos rizikó faktornak tekinthetők a családban előfordult melanomás esetek. Az újonnan diagnosztizált betegek körülbelül 5-12%-ánál előfordult egy vagy több elsőfokú rokonnál ilyen típusú malignus elváltozás. A kutatások során két, melanomára hajlamosító gén öröklött mutációját mutatták ki, a 9p21-es lokuszon lokalizálódó p16 (a vizsgált családok közel 20%-ában) és a 12q13-as lokuszon elhelyezkedő CDK4 mutációját, de megfigyelések szerint az INK4a csírvonal mutációja is szerepet játszhat a familiáris melanomák kialakulásában^{8, 14-17}.

Meghatározó tényezők továbbá a bőr-, haj-, szem színe, a naevusok száma és pigmentáltsága valamint a nem^{2, 8, 18}. A betegség megjelenését és felismerését követően a prognózist befolyásolja az életkor, a daganat lokalizációja és vastagsága, a tumor felszínének kifeléelyesedése, az infiltrált nyirokcsomók száma és az infiltráció mértéke (mikro- és

makrometasztázisok). A beteg túlélési esélyei és az alkalmazott terápia sikere nők esetében jobb¹⁹.

A melanoma klinikai altípusai

A malignus melanomák 4 klinikai-patológiai altípusba sorolhatók. Az egyik legelterjedtebb, az daganatok közel 75%-át kitevő kevésbé rosszindulatú, felszínesen terjedő melanoma (superficial spreading melanoma: SSM). Az SSM gyakran már meglévő naevus talaján keletkező aszimmetrikus, változatos színű és szabálytalan szélű lézió.

A második leggyakoribb típus a noduláris melanoma (NM), mely a melanomás betegek közel 10-20%-ánál figyelhető meg. A daganatos sejtek ennél az altípusnál azonnal a mélybe terjednek, így ezek a tumorok rosszabb indulatúak és nagyobb az áttétképzés valószínűsége²⁰. A noduláris melanoma többnyire ép bőrön megjelenő gyorsan növekvő lézió, mely vérzékeny, gyakran amelanotikus. Mivel a tumor pigmentáltsága lehet egyenletes és széle nem feltétlenül szabálytalan, könnyen összetéveszthető a bazálsejtes karcinómával, a szeborreás keratózissal vagy akár jóindulatú anyajegyekkel.

A lentigo maligna melanoma (LMM), a melanomák harmadik altípusa, a napsugárzásnak kitett bőrfelületen, gyakran az arcon, általában idősebb korban jelentkezik. Az előző két altípustól eltérően, az LMM kialakulásában egyértelmű összefüggés található az UV-expozícióval. A daganat növekedése lassú, gyakran évekig az epidermiszre korlátozódik és a dermális invázió akár 10-15 év elteltével indul meg. Megjelenésében az SSM-hez áll közel.

Az akrálisan lokalizált melanoma (ALM), a nem kaukázusi népességben előforduló leggyakoribb melanoma altípus. Általában a tenyéren és a talpon vagy a köröm alatt, esetleg a genitális vagy az orális nyálkahártyán, pigmentált foltként jelenik meg. A noduláris melanoma mellett ez a típus a legagresszívebb lefolyású, mivel általában későn kerül felismerésre, és a helyzetéből fakadó gyakori traumák szintén kedveznek a metasztázis képződésnek.

A melanoma TNM-klasszifikációja

Az egységes stádiumbesorolás a daganat biológiai viselkedésével kapcsolatos új tudományos felismerésekben alapvető fontosságú, nélkülözhetetlen a betegség kórjóslatának meghatározásában és az ennek megfelelő leghatékonyabb kezelési terv felállításában. Az elmúlt 60 évben számos munkacsoport tanulmányozta azokat a klinikai és patológiai faktorokat, melyek a melanoma kimenetelére hatást gyakorolnak. A betegség prognózisát

befolyásoló fő faktorokat figyelembe véve 2002. januárjában számos nemzetközi szervezet ajánlásával az *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) a melanoma biológiáját pontosabban leíró, az emlőrák analógiájára kialakított, tumor-nyirokcsomó-metasztázis (TNM) stádiumbesorolást hozott létre, melynek értelmében az őrszemnyirokcsomó-biopszia eredménye kritikus a melanoma prognózis felállításában¹⁸. Az osztályozás fő szempontjait az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. Táblázat
A melanoma malignum TNM-osztályozása¹⁸

T (primer tumor) Vastagság és ulceráció^a	N (nyirokcsomó érintettség)	M (metasztázis)
T1 stádium: 1,0mm ≥ a. ulceráció nélkül b. ulcerációval	N1 stádium: 1 regionális nyirokcsomó a. mikrometasztázis ^b b. makrometasztázis ^c	M1 stádium: távoli kután, szubkután, nyirokcsomó metasztázis
T2 stádium: 1,01-2,0mm a. ulceráció nélkül b. ulcerációval	N2 stádium: 2-3 regionális nyirokcsomó a. mikrometasztázis b. makrometasztázis c. „in transit” / „satellita” metasztázis, nincs nyirokcsomó érintettség	M2 stádium: tüdő metasztázis
T3 stádium: 2,01-4,0mm a. ulceráció nélkül b. ulcerációval	N3 stádium: 4 < regionális nyirokcsomó / N2c+nyirokcsomó metasztázis	M3 stádium: egyéb belszervi metasztázis / emelkedett LDH ^d szint
T4 stádium: 4,0mm < a. ulceráció nélkül b. ulcerációval		

^aulceráció: a daganat felszínének kifelélyesedése

^bmikrometasztázis: nem tapintható, „sentinel” nyirokcsomó biopsziával igazolt

^cmakrometasztázis: klinikailag észlelhető, szövettanilag igazolt

^dLDH: laktátdehidrogenáz

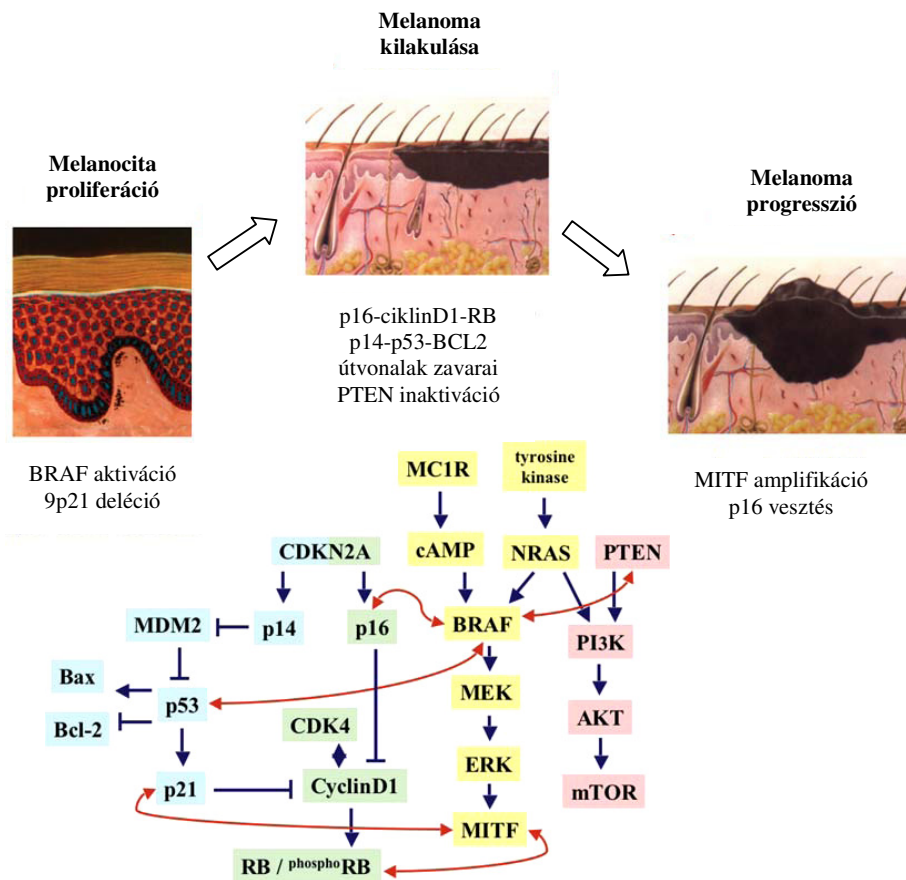
A jelenlegi TNM-klasszifikáció szerint a tumorok besorolásának fő szempontjai (1. táblázat):

a) a tumor mm-ben megadott vastagsága (T1: < 1mm, T2: 1-2mm, T3: 2-4mm, T4: > 4mm) és a primer tumor kifelélyesedése (korábban nem szerepelt a besorolás kritériumai között) („T” klasszifikáció); b) a regionális nyirokcsomók érintettsége, ami statisztikai elemzések szerint a melanoma progressziója szempontjából a legfontosabb korai prediktor, ezért a nyirokcsomóstátusz patológiai felmérésére bevezették az érintett nyirokcsomók számának meghatározását. Az új osztályozás prognosztikailag elkülöníti a klinikailag felismerhető („makrometasztázis”) és a csak patológiai vizsgálattal kimutatható áttéteket („mikrometasztázis”) („N” klasszifikáció); c) távoli áttétek megléte és azok lokalizációja („M” klasszifikáció).

Malignus melanoma genetikai eltérései

Klinikai szempontból alapvető fontosságú a tumor korai felismerése és minél előbbi eltávolítása. A primer melanoma és a hozzá tartozó metasztázis genetikai aberrációinak feltérképezése a daganat progressziójának és terjedésének jobb megértésén túl, a „biomarkerek” alkalmazásával lehetővé válhat a daganat viselkedésének megjóslása is^{3, 21, 22}. A tumor kialakulásának és progressziójának háttérben számos kromoszóma aberráció áll. Standard citogenetikai- illetve *in situ* hibridizációs módszerekkel (fluoreszcencia *in situ* hibridizáció és komparatív genom hibridizáció) az 1-es, 6-os, 7-es 8-as 9-es, 10-es és 11-es kromoszómák gyakori eltéréseit mutatták ki.

1. Ábra A malignus melanoma progressziójának molekuláris modellje²³



Ezek az aberrációk kromoszómák számbeli eltéréseit, különböző onkogének amplifikációit, tumorszuppresszor gének delécióit foglalják magukba^{1, 13, 20, 22, 24, 25}. A melanoma progresszióban érintett molekuláris útvonalakat az 1-es ábrán foglaltuk össze. Sporadikus melanomákban gyakori megfigyelés az INK4A/ARF, KIP1 (p27), TP53 és a

PTEN (10q23) tumorszupresszor lokuszok deléciója valamint a BRAF vagy H- és N-RAS GTPáz-ok aktivációs mutációja, az NF- κ B, ATF2 transzkirpciós faktorok megemelkedett szintje, a β -catenin expresszió csökkent expressziója és a β 3 integrin alegység eltérései^{13, 15, 16, 20, 22, 25}. A jelenleg elfogadott melanoma progressziós modell szerint, a melanocitákból a diszplasztikus naevus, radiális növekedési fázis (felszínesen terjedő), vertikális növekedési fázis (noduláris) lépésein keresztül a metasztázishoz vezető út során: a (del)9p21 (p16-INK4A); az N-RAS, BRAF és p58 gén mutációk; a 10q, 6q, 1p és a 3. kromoszóma hiánya; 8q, 6p és 7q többlet játszanak döntő szerepet¹⁵.

***In situ* hibridizációs módszerek szerepe a melanoma kutatásban**

Jelenleg a lokalizált, kután melanoma kezelése elsődlegesen radikális sebészi beavatkozáson alapul. Sajnos a sebészeti beavatkozások extrém mértékű fokozása nem eredményezte a lokális recidívák és a nyirokcsomó vagy távoli metasztázisok kialakulásának megakadályozását. Az előrehaladott vagy disszeminált tumorok adjuváns terápiát igényelnek, ez azonban, az intenzív kutatások ellenére, még mindig messze nem kielégítő, és a betegek jelentős többsége a metasztázis következtében hal meg. Ennek oka lehet az, hogy a tumor sejtek agresszív proliferációs tulajdonsága erőteljes invazivitással illetve motilitással társul, és már igen korán kiszabadulnak, és távolra vándorolnak a primer tumortól a metasztázis kialakulásáért felelős tumor sejtek. Hasonlóan számos szolid tumorhoz, a melanoma is olyan genetikai betegség, melynek kialakulása és progressziója során a genetikai eltérések sorozatos akkumulációja révén sérülnek a génextpressziót szabályozó molekuláris mechanizmusok, melyek onkogének aktiválódását és onkoszuppresszor gének inaktiválódását eredményezik. A gyakori alterációt mutató géneknek, az intenzív kutatások ellenére is, még csak kis hányadát ismerjük. Jelenleg még ismeretlenek azok a molekuláris elváltozások vagy elváltozás sorozatok, melyek sikeresen funkcionálhatnak terápiás célpontként.

Az elmúlt évtizedben tért hódított microarray technikák olyan lehetőséget szolgáltatnak a malignus betegségek kialakulásának és progressziójának háttérben álló genetikai hibák megismerésére, melyek lehetővé teszik a daganatok pontosabb stádium beosztását, olyan altípusok azonosítását, melyek sokkal jobb összefüggést mutatnak a megbetegedések klinikai lefolyásával, a különböző terápiák iránti érzékenységgel. Ezekkel a nagyfelbontású és nagyhatékonyságú módszerekkel lehetővé válik új molekuláris célpontok azonosítása. A microarray-k meghatározott mintázatban felvitt és kihorgonyozott nagyszámú 25-60-mer oligo, BAC (bacterial artificial chromosomes) vagy cDNS szakaszokat tartalmazó

szilárd hordozók (legtöbbször üveg, de lehet arany vagy speciális műanyag felület is). A microarray technológia DNS vagy RNS *in situ* hibridizációján alapul, a fluoreszcens festékekkel jelölt RNS vagy DNS minták a szintetikus próbákhoz a komplementaritás szabályai szerint kapcsolódnak. Minden egyes kölcsönható minta egy génre vagy DNS szakaszra specifikus, amelynek pozícióját ismerjük a szilárd felületen.

A melanomák génexpressziós vizsgálatai eddig elsősorban melanoma metasztázisokra és melanoma sejtvonalakra korlátozódtak²⁶⁻³¹. Számos átfogó tanulmány született melanoma sejtvonalak és primer sejt kultúrák microarray eredményeiből³², ugyanakkor egy *in vitro* rendszer kísérletes eredményeinek extrapolálása *in vivo* rendszerre nem könnyű feladat. A tumorszövet sejtjeinek háromdimenziós térben történő kommunikációja mellett számolnunk kell a daganatsejtek és a tumormátrix, valamint a gazdaszövet sejtjeinek interakciójával is. Ezek a kapcsolatok, legyen szó akár endokrin- parakrin szabályozási folyamatokról másodlagos hírvivő molekulák és jelátviteli útvonalak aktiválásával, illetve sejt-sejt adhéziós valamint sejt-mátrix adhéziós molekulák fizikai interakciójáról, szervesen befolyásolják a melanoma génexpressziós mintázatát, hatással vannak a tumorsejtek viselkedésére.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre primer melanomák génexpressziós mintázatára vonatkozóan. Melanoma minták expressziós analízisét megnehezíti az egységes kontroll minta hiánya. A közlemények egy részében naevus mintát³³, mások a tumor minták RNS elegendőét használják viszonyítási alapként^{34, 35}. Primer melanoma biopsziákon eddig elvégzett expressziós analízisekben kimutatott progresszióval összefüggő génexpressziós változások nem fednek át egymással. Az adatok összehasonlíthatóságát megnehezíti az eltérő kontroll minták használatán kívül, a különböző array platform és bioinformatikai rendszerek alkalmazása is.

A microarray kísérletekkel azonosított génexpressziós változások háttérben számos molekuláris defektus állhat. Génexpresszió szint növekedést okozhat pl.: DNS szekvenciák kópiaszám többlete, ugyanakkor az adott DNS lokusz vesztese génexpresszió csökkenést eredményezhet. Emlő és prosztatában daganatokon elvégzett génexpressziós és komparatív genom hibridizációs array (aCGH) kísérletekben szoros korrelációt mutattak ki a gén kópiaszám és a gén expresszió szintje között^{36, 37}. Az említettekén kívül számos egyéb más aberráció is állhat a génexpresszió megváltozásának háttérben. Mutációk, transzlokációk valamint transzkripciós faktorok szintjén jelentkező szabályozási folyamatok vezethetnek a gén konstitutív aktivációjához illetve csendesítéséhez.

A daganatok citogenetikai eltéréseinek meghatározására évtizedekig a klasszikus citogenetika volt az egyetlen módszer. A legtöbb szolid tumornál azonban az *in vitro*

sejttenyésztési, kromoszómapreparálási módszerek alkalmazása sikertelennek bizonyult. A fluoreszcencia *in situ* (FISH) és komparatív genomiális hibridizáció (comparative genomic hybridization: CGH) technikák kombinált alkalmazásával a daganatsejtek genetikai eltéréseit azok *in vitro* manipulálása nélkül tudjuk tanulmányozni³⁸. A FISH-el (centroméra és lokusz specifikus DNS próbákkal) a sejtek kromoszómális eltéréseit interfázisos sejtekben vizsgálhatjuk, függetlenül azok proliferatív tulajdonságaitól. Nagyon fontos, hogy ezzel a módszerrel a daganatsejtek közötti genetikai heterogenitás is tanulmányozható és a normál sejtek kontaminációja kevésbé zavaró, mint más molekuláris módszereknél.

A CGH módszer elve hasonló a FISH-hez, de további előnye, hogy a tumorsejtek genetikai analizését a teljes genomra biztosítja. CGH-el specifikus, az adott tumor típusra jellemző, nem véletlenszerű genetikai eltéréseket tudunk meghatározni azok előzetes ismerete nélkül³⁹. Jelenleg a legegyszerűbb és leggyorsabb molekuláris citogenetikai módszer a viszonylag nagyméretű genetikai eltérések kimutatására. A CGH módszernél a jelzett DNS próbákat a tumor és normál sejtek teljes genomiális DNS-ei helyettesítik. A normál sejtekből származó genomiális DNS referencia DNS-ként szolgál. A kromoszómális CGH-nél a target DNS minden esetben normál egyénből származó kromoszóma preparátum.

A CGH ismert és korábban ismeretlen genetikai eltérések felismerésén túl, lehetőséget szolgáltat a daganatprogresszió klonális expanszióját kísérő genetikai eltérések felismerésére, daganat specifikus gének azonosítására, továbbá a módszerrel a génexpresszió megváltozását eredményező genomiális alterációk is felismerhetők.

A microarray technika lehetőséget nyújt több tízezer gén vizsgálatával új eddig ismeretlen eltérések karakterizálására, ugyanakkor a módszer nehézségét és bizonytalanságát éppen a több tízezer paraméter egy reakcióban történő vizsgálata okozza. Ez egyrészt nagy mennyiségű adathalmazt jelent, másrészt bonyolult, többváltozós statisztikai függvényeket igényel az elemzéshez. Így tehát a microarray-el azonosított új eltérések mellett, nagyon fontos a már azonosított alterációk és a melanoma progresszió közötti kapcsolat fókuszált elemzése nagyszámú melanoma mintán.

Korábban intézetünkben primer melanomákon végzett kromoszómális CGH-el gyakori eltérésként figyeltük meg a 7-es kromoszóma rövid karjának DNS többletét, mely egyes léziókban az egész rövidkart érintette, a daganatok többségében a 7p12 lokusz amplifikációját foglalta magába²⁴. A 7p12-es régión lokalizálódó epidermális növekedési faktor (EGFR) a tirozinkináz receptor család tagja. A receptor extracelluláris régiója specifikus ligand megkötésével a receptor homo- illetve heterodimerizációját eredményezi, mely az intracelluláris rész tirozinkináz foszforilációjával az aktív receptorforma

kialakulásához vezet. Az aktivált receptor a RAS/RAF/MEK/MAPK és PI3K/Akt útvonalon hatva eredményezi a ligand által kiváltott sejt szintű válasz kialakulását.

Az EGF receptor megnövekedett expresszióját, a receptor gén amplifikációját és mutációját számos daganatban megfigyelték. Az utóbbi évtizedben az EGF receptor a daganatellenes terápia fontos célpontjává vált. Olyan molekuláris terápiát fejlesztettek ki (gefitinib, erlotinib, cetuximab), melyek az EGFR fehérje extra- illetve intracelluláris részéhez kapcsolódva a receptor inaktivációját eredményezi. Annak ellenére, hogy az EGFR molekula elsőként szerepelt a daganatellenes terápia célpontjaként, a mai napig nem tisztázott a receptor fehérje expressziós szintje és a terápia hatékonyság molekuláris háttere közötti összefüggés⁴⁰.

A melanoma sejtek felszínén először Koprowski és munkacsoportja mutatta ki az EGFR fehérje túlzott mértékű kifejeződését késői stádiumú daganatokban, mely a 7-es kromoszóma poliszómiájával asszociálódott. Feltételezték, hogy a 7-es kromoszóma aneuszómiájából adódó EGFR gén többlet a daganatsejtek számára szelekciós előnyt jelent a tumorigenezis késői szakaszában, bár nem tanulmányozták a génkópiaszám eltérés és a betegség kimenetele közötti összefüggést⁴¹. Koprowskiék megfigyelése nyomán több tanulmány vizsgálta az EGFR melanoma progresszióban betöltött szerepét. Immunhisztokémiai kísérletekkel de Witt és munkacsoportja az EGFR fehérje emelkedett expresszióját találta a melanoma progresszió különböző szakaszaiban⁴². Megfigyelésük szerint a különböző stádiumok közötti különbség azonban nem számottevő. Továbbá Mueller és mtsai. eredményei szerint metasztatikus melanoma sejtvonallal SCID egérben indukált spontán metasztázis képződés anti-EGFR antitesttel szuppresszálható, ami arra enged következtetni, hogy a vizsgált antitestnek antimetasztatikus hatása van⁴³. Ugyanakkor más munkacsoportok sem melanoma sejtvonalakban sem melanoma mintákban nem tudtak kimutatni EGFR fehérje expressziót⁴⁴,⁴⁵. A 7-es kromoszóma kópiaszám eltérését vizsgálva megállapították, hogy a 7-es kromoszóma poliszómiája melanomákban rossz prognózissal, csökkent túléléssel szignifikáns mértékben társítható⁴⁶,⁴⁷. Annak ellenére, hogy az EGF receptor sejtfelszíni túlzott expresszióját először melanomában írták le, a génamplifikációt egyedi sejtek szintjén, továbbá a gén szintű eltérések mRNS és fehérje expresszióra gyakorolt hatását eddig még nem tanulmányozták.

Irodalmi adatok a 9p21-es lokusz eltérések melanomagenézisben betöltött fontos szerepét hangsúlyozzák. Sporadikus és familiáris melanomákra egyaránt jellemző a 9p21-es lokusz aberrációja, amely magában foglalhatja a lokusz pontmutációját, promóter metilációját vagy delécióját. Ez az alteráció a lokuszon kódolt tumorszuppresszor gének (p16^{INK4A}, p14^{ARF}, p15^{INK4B}) expressziójának változását vonhatja maga után. Ha a p16^{INK4A} fehérje hibás vagy

hiányzik, a sejt akkor is belép az S-fázisba, ha a sejt normál működéséhez szükséges javító mechanizmusok még nem fejeződtek be. A melanoma családi halmozódását mutató esetekben talált CDKN2A germinális mutáció – különösen az INK4A a kódolásáért felelős exont érintő egyértelmű bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a p16^{INKB} fehérje fontos szerepet tölt be a melanoma szupressziójában^{48, 49}. A 9p21-es lokuszon, az INK4A génnel szoros kapcsolatban helyezkedik el egy másik tumorszupresszor gén is, az ARF (p14) (mindkettőt a CDKN2A régió kódolja alternatív leolvasási keretben), mely szintén fontos szerepet játszhat a melanomák kialakulásában.

Intézetünkben kromoszómális CGH-el a 9-es kromoszóma rövid karjának delécióját mutattuk ki a primer melanomákban (48%) és a melanoma metasztázisokban (58%)²⁴. Eredményeink jó korrelációt mutatnak az irodalmi adatokkal (Bastian 1998). Számos tumorban a deléció csak a rövid karra terjedt ki, míg más esetekben a teljes kromoszóma delécióját figyeltük meg. Nagyobb felbontású array CGH adataink a 9p21-es régióba lévő klónok deléciója mellett, a lokusz extra kópiaszámára is felhívták a figyelmet.

A 9p21 lokusz deléciójának mértékéről és a melanoma iniciációban és progresszióban betöltött szerepéről ellentmondásos LOH és immunhisztokémiai adatokat közöltek. A rendelkezésre álló LOH adatok egy adott lézió átlagos kópiaszám eltéréséről nyújtanak csak felvilágosítást, nem adnak információt az alterációk tumoron belüli heterogenitására vonatkozóan. Nincsenek adatok a 9p21 sejtszintű eltéréséről és a kópiaszám változások génexpresszióra gyakorolt hatásáról.

A fentiek alapján doktori disszertációmban az array technikák alkalmazásával célom volt a humán malignus melanoma progressziójához rendelhető genetikai és génexpressziós változások karakterizálása, a génexpressziós változások és gén kópiaszám eltérések közötti összefüggés tanulmányozása. Az azonosított gének funkcionális csoportosítása, jelátviteli útvonalakban betöltött szerepének vizsgálata. FISH módszerrel az EGFR onkogén amplifikáció mértékének meghatározása, az eltérések korrelációja a daganatok klinikopatológiai paramétereivel, valamint az amplifikáció gén- és fehérjeexpresszióra gyakorolt hatásának megállapítása. Továbbá célom volt a 9p21 lokusz eltéréseinek azonosítása egyedi sejtek szintjén primer melanomákban, a 9p21 melanoma progresszióban betöltött szerepének vizsgálata, a génkópiaszám eltérések és a 9p21-en lokalizálódó CDKN2A génexpressziója közötti összefüggés tanulmányozása.

Célkitűzések

A malignus melanomák agresszív metasztázis képző tulajdonságának genetikai hátteréről az intenzív kutatások ellenére is még viszonylag keveset tudunk. Jelenleg még nincsenek olyan molekuláris elváltozások azonosítva, melyek sikeres terápiás célpontként funkcionálhatnak. Ezért kutatásaink során kiemelten fókuszálunk azoknak az alterációknak az azonosítására, melyek a különböző biológiai viselkedésű melanomákra karakterisztikusak, célunk olyan eltérések keresése, melyek diagnosztikus értékűvé válhatnak és hozzájárulhatnak a betegség kimenetelének pontosabb megjósolásához vagy terápiás targetként szolgálhatnak.

Vizsgálataink során célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. Az agresszív biológiai viselkedéssel jellemezhető humán malignus melanoma különböző klinikopatológiai típusai és melanoma metasztázisok génexpressziós eltéréseinek tanulmányozása microarray technikával.
2. Primer melanomák array komparatív hibridizációs (aCGH) és microarray alapú génexpressziós eredmények összehasonlítása. A génexpressziós változások hátterében álló génkópiaszám eltérések azonosítása.
3. Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák FISH analízise 7-es és 9-es kromoszóma centoméra, valamint EGFR gén (7p12) és 9p21-es lokusz specifikus DNS próbákkal. A gének kópiaszám eltéréseinek elemzése nagyszámú primer melanoma mintán.
4. A 7p12 és 9p21 lokusz eltéréseinek és a betegek klinikopatológiai adatainak korrelációs analízise.
5. A kimutatott génkópiaszám változások gén- és fehérjeexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata qPCR és immunhisztológiai technikákkal.

Anyagok és módszerek

Melanoma szövetminták FISH analízisekhez

FISH analíziseinket 81 friss és fagyasztott primer melanoma mintából készített lenyomat preparátumon végeztük el. Az EGFR és 9p21 FISH kísérletek nem azonos időben történtek, így a minták a két elemzés során nem fedtek át. A melanoma minták klinikopatológiai tulajdonságait a 2-es és 3-as táblázatban foglaltuk össze.

2. Táblázat

Primer melanoma minták klinikai adatai az EGFR gén kópiaszámának meghatározásához

A melanoma minták kliniko- patológiai adatai	Eset szám
Tumor típus ^a	
NM	39
SSM	42
Nem	
Férfi	43
Nő	38
Kor (év)	
20-50	23
>50	58
Breslow vastagság (mm) ^b	
<2,00	21
2,01-4,00	16
>4,01	44
Clark inváziós szint	
I, II, III	27
IV, V	54
Ulceráció	
Nem	40
Igen	41
Lokalizáció	
Törzs	42
Végtagok	27
Fej	10
Metasztázis képzés ^c	
Nem metasztatizál	20
Metasztázist képez	41
Túlélés ^d	
Él	28
Meghalt	33

^aNM: noduláris melanoma, SSM: superficial spreading melanoma

^bTumor vastagság kategória

^cMetasztázis képzés 5 év követési idő belül.

^d5 éves követési időn belüli túlélés.

3. Táblázat

Primer melanoma minták klinikai adatai a 9p21-es lokusz kópiaszám eltéréseinek analíziséhez

A melanoma minták kliniko- patológiai adatai	Eset szám
Tumor típus ^a	
NM	42
SSM	39
Nem	
Férfi	47
Nő	34
Kor (év)	
20-50	25
>50	56
Breslow vastagság (mm) ^b	
<2,00	17
2,01-4,00	14
>4,01	50
Clark inváziós szint	
I, II, III	30
IV, V	51
Ulceráció	
Nem	35
Igen	46
Lokalizáció	
Törzs	45
Végtagok	28
Fej	8
Metasztázis képzés ^c	
Nem metasztatizál	38
Metasztázist képez	43

^aNM: noduláris melanoma, SSM: superficial spreading melanoma

^bTumor vastagság kategória

^cMetasztázis képzés 5 év követési idő belül.

A melanoma minták a Debreceni Egyetem OEC, Bőrgyógyászati Klinikáról származtak. A vizsgálatokhoz szükséges intézményi Etikai Bizottság engedélyével rendelkezünk.

A FISH kísérleteinket tumor mintákból készült lenyomat preparátumokon végeztük el. A tumor szövetet, a sejtek jobb adhéziójának érdekében felületkezelt tárgylemezhez érintettük, majd 10 percig Carnoy's fixálóval (3:1 metanol:ecetsav) fixáltuk, és szobahőmérsékleten megszárítottuk. A lenyomat preparátum előnye a hagyományos metszetekkel szemben, hogy nem kell számolnunk a szignálvesztést eredményezhető metszet készítésből származó genetikai anyag veszteséggel, így módon a FISH értékelése még pontosabbá válik.

A microarray analíziséhez alkalmazott minták klinikai adatait a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. Táblázat

Microarray technikával elemzett melanoma minták klinikai adatai

Minta szám	Hisztológiai altípus	Nem	Kor (év)	Breslow vastagság (mm)	Clark	Lokalizáció	Ulceráció ^a	Metasztázis képzés
1	in situ	M ^b	>50			végtag		
2	NM ^d	F ^c	>50	≥4,01	III	végtag	x	
3	NM	M	20-50	≥4,01	IV	törzs	x	
4	NM	M	>50	≥4,01	V	végtag	x	x
5	NM	F	>50	≥4,01	V	végtag	x	x
6	NM	M	20-50	≥4,01	V	fej	x	
7	NM	M	>50	≥4,01	IV	végtag	x	
8	NM	M	>50	2,01-4,00	IV	törzs	x	x
9	NM	M	>50	≥4,01	V	fej	x	
10	NM	F	>50	2,01-4,00	III	végtag	x	
11	NM	F	>50	2,01-4,00	III	végtag	x	
12	NM	M	>50	≥4,01	V	törzs		
13	NM	F	>50	2,01-4,00	IV	végtag		
14	NM	F	>50	≥4,01	V	végtag	x	
15	NM	M	>50	≤2,00	IV	végtag	x	
16	NM	F	>50	≥4,01	V	végtag	x	x
17	NM	M	>50	≥4,01	III-IV	fej	x	
18	NM	M	>50	≥4,01	V	törzs	x	x
19	SSM ^e	M	>50	≤2,00	III	törzs	x	
20	SSM	F	>50	≤2,00	III	végtag		
21	SSM	F	20-50	>4,01	IV	törzs	x	x
22	SSM	M	>50	≤2,00	IV	végtag		
23	SSM	M	>50	≤2,00	III	végtag		
24	SSM	F	>50	≤2,00	III	végtag		
25	SSM	F	>50	≤2,00	II-III	törzs		
26	SSM	F	>50	≤2,00	III	végtag		
27	SSM	F	>50	≤2,00	IV	végtag	x	
28	SSM	F	>50	≤2,00	III	végtag		
29	SSM	F	>50	≤2,00	III	végtag		
30	SSM	M	>50	2,01-4,00	III-IV	végtag	x	x
31	SSM	F	20-50	≥4,01	III	végtag	x	
32	SSM	M	>50	≤2,00	III	törzs		
33	SSM	F	>50	≤2,00	II	törzs		
34	SSM	F	20-50	≤2,00	III	végtag		
35	SSM	F	>50	≤2,00	III	törzs		
36	SSM	F	20-50	≤2,00	III	törzs		
37	SSM	M	20-50	≤2,00	III	végtag		
38	metasztázis	F	<20			végtag		
39	metasztázis	F	>50			fej		
40	metasztázis	F	20-50			törzs		
41	metasztázis	M	>50			fej		
42	metasztázis	F	>50			törzs		
43	metasztázis	F	>50			fej		

^aulceráció: a daganatok felszínének kifekélyesedése

^bM: férfi

^cF: nő

^dNM: noduláris melanoma

^eSSM: superficial spreading melanoma

Melanoma sejtvonalak, sejttenyésztés

Kísérleteink során az alábbi különböző metasztatizáló tulajdonsággal rendelkező sejtvonalakokat alkalmaztunk:

- **WM35:** benignus, nude egérben nem-tumorkeltő, korai (RGP) fázisú humán melanoma sejtvonala
- **M24:** nyirokcsomó metasztázisból izolált nude egérben tumorkeltő humán melanoma sejtvonala
- **M24-met:** az M24-ből származtatott agresszív, metasztatizáló sejtvonala⁴³
- **WM983A:** késői (VGP) fázisú primer tumorból származtatott metasztatikus képességgel rendelkező humán sejtvonala
- **WM983B:** a WM983A-ból származtatott agresszív, metasztatizáló humán sejtvonala⁵⁰
- **HT168:** az A2058-ből *in vivo* adaptációjával kialakított HT168 tumorból származtatott sejtvonala⁵¹,
- **HT168-M1:** a HT168 sejtek immunszuppresszált egér lépébe történő injektálást követően létrehozott agresszív melanoma sejtvonala
- **35/01:** egy 69 éves férfi SSM altípusú daganatából izolált agresszív melanoma sejtvonala, mely egy éven belül máj áttétet képezett. Nude egérbe oltva a sejtvonala májáttétet képezett⁵².

Valamennyi sejtvonalat 10% foetalis borjú szérumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) tenyésztettük (37°C, 5% CO₂). A „monolayer”-ben növekvő, adherens sejteket 0.2%-os tripszin/EDTA oldattal történt kezelést követően (0.53 mM, Sigma Aldrich, Németország) PBS-el 2x mostuk (pH: 7.2), majd a sejt pelletet 0.75mM-os KCl-al kezeltük (hipotóniás kezelés), 20 perc 37 °C. A tárgylemezre történő kicseppentést követően Carnoy's fixálóval (3:1 metanol:ecetsav) fixáltuk, és -20°C-on tároltuk..

Normál limfociták preparálása

Egészséges egyén perifériás véréből származó normál limfocitákból kromoszóma preparátumot készítettünk a EuroClone® Chromosome kit „P” segítségével az alábbiak szerint: 500 µl vért a heparinos médiumba pipettáltunk és steril körülmények között 72 órán át tenyésztettük (5% CO₂, 37°C). Ezt követően a mintákhoz colchicint (10 µg/ml) adtunk és 4 órán át a sejteket tovább tenyésztettük, majd lecentrifugáltuk, 0,5 ml felülúszóban a pelletet felszuszpendáltuk, és a sejtszuszpenzió állandó mozgatása mellett óvatosan 5 ml, szobahőmérsékletű 75 mM-os KCl-ot adtunk. A mintákat ezt követően szobahőmérsékleten

20 percig inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk. A 0,5 ml-t felülúszóban a sejteket ismét felszuszpendáltuk és 5 ml módosított Ibraimov desztillált víz, ecetsav, metanol) oldatot adtunk. A sejteket lecentrifugáltuk. A mintákat 5 ml frissen készített Carnoy's fixálóval fixáltuk. Az utóbbi fixálást mindaddig ismételtük, amíg a citoplazma jelen volt. A sejt koncentrációt optimálisra állítottuk és a sejteket magas páratartalom biztosítása mellett nedves tárgylemezre cseppentettük, szobahőmérsékleten megszárítottuk és -20°C-on tároltuk.

DNS próbák

A kísérleteink során alkalmazott DNS specifikus próbák az alábbiak voltak:

7-es kromoszóma centroméra-specifikus/ EGFR génspecifikus DNS próba

9-es kromoszóma centroméra-specifikus / 9p21 lokuszspecifikus DNS próba

A DNS specifikus próbákat a Vysis cégtől szereztük be. A centroméraspecifikus próbák zölden fluoreszkáló „Spectrum Green”-nel konjugált dUTP-vel, míg a génspecifikus próbák a narancs fluoreszcens fényt kibocsátó „Spectrum Orange”-val kapcsolt dUTP-vel voltak jelölve. A sejtmagok jelzésére diaminofenilindolt (DAPI, kék fluoreszcencia) használtunk, mely antifadeben (Vectashield, Vector USA) volt oldva.

A fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

A FISH-t az irodalomban leírt protokoll alapján végeztük el, ahol szükséges volt a fluoreszcens szignál intenzitásának növelésére, protokoll módosításokat vezettünk be⁵³.

A FISH kísérleteket hibridizációs kamrában (HYBrite) végeztük el. A DNS próbát és a melanoma mintákat 73°C-on 2 percig együtt denaturáltuk, majd egy éjszakán át 37°C-on hibridizáltuk. A nem kötődő DNS próbák eltávolítása 45°C-on, hibridizáló mosó oldattal történt (3 x 10 perc külön-külön). A sejtmagokat 200 ng/ml antifade-ben oldott DAPI-val jelöltük. Az antifade a fluoreszcens jelek kioltását akadályozza meg. Minden kísérlettel párhuzamosan kontrollként normál limfocitából készült preparátumot alkalmaztunk, a kontroll hibridizáció eredménye a vizsgált lokuszra és kromoszómára a sejtek 98%-ában diploidnak adódott. A normál sejtekben elenyésző százalékban detektált, a normálistól eltérő érték a próba target szekvenciához történő nem megfelelő hibridizációjából vagy a szignálok átfedéséből származott.

Kiértékelésnél 100-300 sejtben számoltuk meg a fluoreszcens jeleket. A FISH-el kapott eredményeket ZEISS Axioplan (Zeiss, Germany) fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük ki. Az alkalmazott objektív nagyítása minden esetben 100-szoros volt. A gerjesztő fény (fényforrás 100 W-os higanygőzlámpa) hullámhosszát megfelelő optikai szűrők alkalmazásával változtattuk. Emissziós szűrőnek a „Pinkel féle” triple bandpass emissziós filterblokkot használtuk, mely alkalmas a kéken fluoreszkáló, sejtmagot jelző DAPI, a zölden fluoreszkáló spektrum zöld és a narancsszínű fluoreszcenciát kibocsátó „Spectrum Orange” megjelenítésére. A fluoreszcens képek rögzítésére a METASystem (Germany) által forgalmazott, FISH analízisre kifejlesztett munkaállomást (DE, Megelőző Orvostani Intézet) alkalmaztuk. A fluoreszcens képek rögzítése az általunk beállított expozíciós idővel történt nagy felbontású CCD (Charge Couple Device) kamera segítségével.

EGFR gén és a 9p21 lokusz kópiaszám eltéréseinek elemzése

Az EGFR génamplifikációs mintázat ellenőrzésére az irodalomban leírt gén kópiaszám kategóriákat alkalmaztuk az alábbiak szerint: *EGFR* génkópiaszám eltérések: i.) *EGFR deléció*: ha az EGFR kópiaszáma kevesebb a 7-es centroméra kópiaszámánál a sejtek több mint 10%-ában, ii.) *látszólagos amplifikáció*: 7-es centroméra és az EGFR gén kópiaszáma megegyezett, de több mint kettő (látszólagos amplifikáció, ahol a kromoszóma sokszorozódása vonja maga után a lokusz amplifikációját), iii.) *kismértékű amplifikáció*: a gén kópiaszáma maximum ötszöröse volt a centroméra szignálszámának, de nem haladta meg a sejtenkénti tíz kópiát, iv.) *nagymértékű amplifikáció*: az EGFR szignálszáma több mint ötszöröse a centroméra szignál számának és meghaladta a sejtenkénti tíz kópiát a sejtek több mint 10%-ában. Az EGFR génindexet az alábbiak alapján határoztuk meg: összes fluoreszcens szignál száma / a FISH-el értékelt sejtmagok száma.

9p21-es kategóriák: i.) *Homozigóta deléció*: csak 9-es centroméra szignál van jelen a sejtek > 20%-ában, ii.) a *9p21 deléció*t az irodalomban leírt kategória alapján definiáltuk: a 9p21-es kópiaszám kevesebb a 9-es centromére szignálszámánál a sejtek > 20%-ában.⁵⁴

FISH eredmények statisztikai analízise

Az egyes melanoma altípusok és a génkópiaszám eltérések (EGFR génindex) közötti összefüggést két-mintás Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) teszt segítségével elemeztük. A különböző altípusba tartozó minták között EGFR kópiaszám eltérések és EGFR/c7 arány

összehasonlításához a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük.

Microarray alapú génexpressziós analízis

Kísérleteinkhez az Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-t használtuk, mely a jelenleg forgalomban lévő génexpressziós array-ek közül az egyik legnagyobb felbontású, összesen 47400 transzkriptum analízisére alkalmas egyetlen hibridizáció során.

Harminchét primer tumor és 6 melanoma metasztázis génexpressziós mintázatát elemeztük. A minták részletes klinikai adatait a 4. táblázatban foglaltuk össze. Az RNS preparálást friss és fagyaszott szövetből RNeasy Mini kit-el (Qiagen, GmbH, Németország) végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján. Az RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektrofotométer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA) berendezéssel határoztuk meg, az RNS integritását az Agilent 2100 Bioanalizátor készülékkel, az RNA 6000 Nano Kit-el (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) ellenőriztük. A p16 génre specifikus QRT-PCR-al valamennyi mintánál vizsgáltuk, hogy a hibridizálódott minták mentesek-e az RNS reverztranszkripcióját gátló biológiai inhibitoroktól. Az RNS minták reverz transzkripcióját, fluoreszcens jelölését és array hibridizációját a heidelbergi European Molecular Laboratory Genomics Core Facility Genechip laboratóriumában végezték el.

A hibridizáció során nyert fluoreszcencia intenzitási adatokat az Agilent Genespring 7.3.1 software segítségével analizáltuk.

Microarray adatok statisztikai elemzése

A génexpressziós eredmények elemzésének első lépése a nyers fluoreszcencia intenzitás adatok többszörös normalizálása volt. Az ún. „per chip” normalizálás lehetővé teszi a nem biológiai természetű, a hibridizáció technikai lépéseiből adódó varianciák kiküszöbölését, a „per gene” normalizálási lépéssel a különböző minták összehasonlítása válik lehetővé.

A normalizációs lépések után a hibridizáció minőségét ellenőriztük, ez az úgynevezett „quality control”. A chipen lévő 47400 transzkript közül csak azokat vettük figyelembe, amelyekhez a tumor minták megfelelően hibridizáltak. A program az egyes array elemekben, „spot”-okban található megfelelő („match”) és nem megfelelő („mismatch”) próbapárok intenzitási értékéből a háttér érték korrekciójával számol egy valószínűségi értéket, amely alapján értékeli a hibridizáció sikerességét az adott spot-hoz. Az analízis során csak azokat a

géneket vettük figyelembe, amelyek a 43 mintából 22-ben jelen („present”) illetve megfelelő („marginal”) indexel szerepeltek. A további statisztikai analíziseket az ily módon szűrt, 25886 transzkriptet tartalmazó génlistán végeztük el.

A 37 primer melanoma globális analíziséhez egy ún. nem szabályozott („unsupervised”) klaszter elemzést, a „Principal Component Analysis (PCA)”-t használtuk, mely lehetőséget ad a tumorok csoportosítására génexpressziós mintázatuk alapján.

További elemzéseinkhez a primer tumorokat klinikopatológiai tulajdonságaik alapján csoportokra osztottuk. Az egyes csoportokon belül az ún. „Volcano plot” elemzést alkalmaztuk, amely lehetőséget ad egy lépésben a minimum kétszeres expressziós különbséget mutató gének detektálására úgy, hogy közben jelöli a szignifikáns mértékben eltérő expressziójú géneket is ($p < 0,05$, hibás találatok korrekciójára: „Benjamini and Hochberg false discovery rate”).

Jelátviteli útvonal analízis

Az analízist a daganatok felszínének kifehélyesedésével összefüggő szignifikáns eltérést mutató gének csoportján (1095) végeztük el. A génlistákban szereplő gének funkcionális szerepét az „Ingenuity Pathways Analysis software (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) és Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>)” programokkal elemeztük. Ezekkel a programmal lehetővé válik a gének különböző jelátviteli útvonalakban való részvételének és kölcsönhatásának azonosítása.

Taqman Low Density Array (TLDA)

A microarray analízis eredményét 94 kiválasztott génnél q-PCR alapú Taqman Low Density Array alkalmazásával erősítettük meg. Az alkalmazott gének listáját az 5. táblázatban foglaltuk össze. A kísértekhez 600 ng RNS reverztranszkripcióját végeztük el High Capacity cDNA Archive Kit-el a gyártó protokolljának megfelelően (Applied Biosystems). A génexpresszió mennyiség meghatározását ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) készülékkel határoztuk meg, a qPCR reakciót a gyártó útmutatásai szerint végeztük el.

5. Táblázat

A microarray analízis eredményeinek megerősítésére alkalmazott gének listája

AB azonosító ^a	Gén szimbólum	AB azonosító	Gén szimbólum	AB azonosító	Gén szimbólum
Hs99999903_m1	ACTB	Hs00193306_m1	EGFR	Hs00234676_m1	MMP16
Hs00374507_m1	AKAP12	Hs00171917_m1	EHF	Hs00233958_m1	MMP1
Hs00178289_m1	AKT1	Hs00171580_m1	ENC1	Hs00234422_m1	MMP2
Hs00209783_m1	ARHGAP8	Hs00214645_m1	EPS8L1	Hs00153408_m1	MYC
Hs00209702_m1	ARHGEF4	Hs00224346_m1	EPS8L2	Hs00211656_m1	MYEF2
Hs00269212_m1	AURKA	Hs00266645_m1	FGF2	Hs00169851_m1	NCAM1
Hs00269944_m1	BRAF	Hs00240796_m1	FGFR2	Hs00707120_s1	NES
Hs00201637_m1	CASP14	Hs00179829_m1	FGFR3	Hs00818842_m1	NR2F1
Hs00234142_m1	CCL3	Hs00170630_m1	FOS	Hs00180035_m1	NRAS
Hs00428422_g1	CCL8	Hs00181830_m1	FPR1	Hs00187290_m1	NRP2
Hs00193177_m1	CCNC	Hs99999905_m1	GAPDH	Hs00261284_m1	PARD6G
Hs00277039_m1	CCND1	Hs00192999_m1	GNG7	Hs00248288_s1	PEG10
Hs00174298_m1	CCR1	Hs00212116_m1	GPRC5B	Hs00751717_s1	PERP
Hs00210453_m1	CD207	Hs00212681_m1	GTSE1	Hs00705810_s1	PHLDA1
Hs00156390_m1	CD63	Hs00193435_m1	HAS2	Hs00180679_m1	PIK3CA
Hs00153168_m1	CDC25A	Hs01866140_g1	HSPD1	Hs00829813_s1	PTEN
Hs00207976_m1	CDC42BPA	Hs00164932_m1	ICAM1	Hs00177193_m1	PTPRG
Hs00169953_m1	CDH2	Hs00155517_m1	IL18	Hs00220628_m1	RAB25
Hs00233365_m1	CDKN2A	Hs00367201_m1	IL1F7	Hs00188156_m1	RAB27B
Hs00265824_m1	CTAG1B	Hs00174103_m1	IL8	Hs00199313_m1	RAB31
Hs00170025_m1	CTNNB1	Hs00236216_m1	ITGB4	Hs00368156_m1	RHOJ
Hs00952036_m1	CTSL2	Hs00158408_m1	JUP	Hs00544666_m1	RHPN2
Hs00154661_m1	CXADR	Hs00358836_m1	KLF4	Hs00174579_m1	SDC1
Hs00171138_m1	CXCL11	Hs01100849_m1	KLK11	Hs00167093_m1	SPP1
Hs00171135_m1	CXCL14	Hs00202752_m1	KLK5	Hs00174970_m1	STC1
Hs00236937_m1	CXCL1	Hs00202347_m1	LPHN2	Hs00172983_m1	TBX2
Hs00236966_m1	CXCL2	Hs00606323_m1	MAGEA2	Hs00171257_m1	TGFB1
Hs00607029_g1	CXCL5	Hs00605615_mH	MAP2K1	Hs00419101_m1	TLE4
Hs00607978_s1	CXCR4	Hs00174838_m1	MCAM	Hs00153349_m1	TP53
Hs00154599_m1	CST6	Hs00179845_m1	MET	Hs00186613_m1	TP73L
Hs00175474_m1	DEFB4	Hs00165156_m1	MITF	Hs00853610_g1	UBE2C
Hs00154858_m1	EFNA2	Hs00153519_m1	MME	Hs00608224_m1	WNT2

^agénspecifikus Taqman assay azonosítója (Applied Biosystems)

Array-CGH (aCGH)

Az array-CGH vizsgálatokat a teljes humán genomot lefedő 2460 BAC (*bacterial artificial chromosome*: mesterséges bakteriális kromoszóma) klónt tartalmazó króm-bevonatú lemezen végeztük a Kaliforniai Egyetem Comprehensive Cancer Center intézetével együttműködésben (*University of California, San Francisco, USA*). A BAC-alapú array kísérletek kivitelezéséhez a primer tumorokból DNS-t preparáltunk Gspin Genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Sangdaewon-Dong, Korea) alkalmazásával. A DNS-ek koncentrációját és tisztaságát NanoDrop készülékkel határoztuk meg. Array CGH analízisre csak fehérjétől ($260/280 \geq 1,80$), oldószertől és sótól ($26/230 \geq 1,90$) mentes DNS mintákat

használtunk. A hibridizáció során 1 µg teszt és referencia (*Promega, Madison, WI, USA*) genomiális DNS-t random-priming módszerrel a Bioprime Labeling Kit (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) segítségével Cy3 dUTP-vel vagy Cy5-dUTP-vel (*Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA*) jelöltük a gyártó használati útmutatóját követve. A be nem épült nukleotidokat a Qiagen QIAquick PCR Purification Kit-tel (*Qiagen, Valencia, CA, USA*) eltávolítottuk. A fluoreszcensen jelölt teszt és referencia DNS-eket Cot-1 DNS (*Roche, Indianapolis, IN, USA*) jelenlétében etanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t hibridizációs pufferben (50% formamid, 10% dextranszulfát, 2xSSC, 4% SDS, és 10µg/µl élesztő tRNS) oldottuk fel. A próbákat 72°C-on 10 percig denaturáltuk, majd 37°C-on 1 óráig inkubáltuk a jelölt DNS-ek jobb kötődése érdekében (preannealing lépés). A hibridizációs keveréket az array-en 48 órán át 37°C-on hibridizáltuk. A lemezeket ezt követően 50% formamid/2xSSC oldatban 45°C-on 15 percig, 2xSSC/0,1%SDS oldatban 45°C-on 20 percig, végül 0,1 mol/L nátrium-foszfát puffer és 0,1% Nonidet P-40 keverékében 10 percig mostuk. A BAC-array-eken a klónokat DAPI-val jelöltük. A BAC array komparatív genom hibridizáció eredményeit Cy3 (zöld fluoreszcencia), Cy5 (piros fluoreszcencia) és DAP (kék fluoreszcencia) szűrővel ellátott CCD kamerával rögzítettük. Az adatok feldolgozása a SPOT 1.2 és SPROC 1.1.1 szoftvercsomaggal történt. A 0,25 (+ 3SD) értéknél nagyobb, illetve -0,25 (- 3SD) értéknél kisebb Log2 értékeket tekintettük kromoszómális többletnek, illetve hiánynak⁵⁵.

Az aCGH és génexpressziós adatok összehasonlítása

A különböző array platformokon végzett kísérleti eredmények összehasonlításához az interneten hozzáférhető „MatchMiner” programot használtuk⁵⁶. Ezzel a programmal lehetővé válik a különböző felbontású array vizsgálatok kombinálása, az aCGH-n lévő BAC klónokkal átfedő Affymetrix szekvenciák azonosítása.

EGFR mutáció analízis

Az EGFR gén 19-es exonjának mutáció analízisét huszonnégy primer melanoma DNS mintán végeztük el olvadás pont elemzéssel⁵⁷. A 19-es exon 170 bázispárnyi fragmentumát amplifikáltuk 2 µL FastStart Mastermix (Roche, Germany), 4 µM MgCl₂, 0,5 µM forward primer (5'-TCTGGATCCCAGAAGGTGAG-3'), 0,5 µM reverz primer (5'-CAGCTGCCAGACATGAGAAA-3'), 0,2 µM 3'FL-jelölt hibridizációs próba (5'-GCA ACATCT CCGAAAGCCAA-3'FL) és 0,2 µM 5' LC Red640- jelölt hibridizációs próba (5'-LCRed640-GGAAAT CCT CGATGTGAGTTTCTG C-3'pH), 2 µL templát DNS (1 µg) mix

használatával. Az alkalmazott PCR ciklusok: inkubáció: 95°C 10 perc; denaturáció: 95°C 10 másodperc, olvadás: 60°C 10 másodperc, az F2-es csatornán jelgyűjtés: extenzió 72°C 8 másodperc, 55 ciklus.

mRNS expresszió meghatározása qPCR technikával

Az EGFR és a CDKN2A gének mRNS szintjét ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) készülékkel határoztuk meg, az EGFR esetében 16, a CDKN2A génnél 30 primer melanoma mintában. A reverztranszkripciót 600 ng RNS-ből a High Capacity cDNA Archive Kit-el a gyártó protokollja alapján végeztük el (Applied Biosystems). Az EGFR mRNS mennyiségi meghatározásához a Hs00193306_m1, a CDKN2A-hoz a Hs00233365_m1 TaqMan® Gene Expression Assay-eket használtuk standard koncentrációban „Universal TaqMan® PCR” mastermixben. Az mRNS mennyiségi meghatározását az ún. $\Delta\Delta CT$ módszerrel végeztük, kontrollként a β -actin (Hs99999903_m1) és gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH; Hs99999905_m1) geometriai középértékét, az ún. „normalizáló faktort” alkalmaztuk.

Immunhisztokémia

Az EGF receptor fehérje expressziós vizsgálatára FISH eredményeink alapján választottunk ki kis és nagymértékű EGFR génamplifikációt hordozó mintákat. A fagyasztott szövetből kriosztáttal (Leica CM1850, Németország) 6 μ m vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. Az EGFR fehérje kimutatásához két különböző antitestet használtunk: 1.) Erbitux® humanizált antitestet (Merck KgaA, 64271 Darmstadt, Németország). 2.) a 528 (IgG2a) antiEGFR monoklonális antitestet (mAb). Az 528 (IgG2a) jelű antitestet az 528: a.k.a. HB-8509 (ATCC, Manassas, VA) hibridóma sejtvonal felülúszójából kinyertünk és protein A kromatográfiával tisztítottuk meg, mindkét antitest az EGF receptor sejt felszíni részéhez kötődik.

A melanoma sejtek kimutatására melanoma specifikus CD63 monoklonális antitestet használtunk.

A metszeteket fixálás után először a FITC-el jelölt EGF receptor elleni (1:100) antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Mosás után 1%-os PBS-ben oldott BSA oldattal blokkoltuk és CD63 melanoma antigénre specifikus antitesttel 1:50 (Vector Laboratories, Inc., USA) inkubáltuk 1 órán keresztül 4°C-on, majd anti-egér-Cy5-IgG (1:100) jelöltük szobahőmérsékleten 60 percig. A jelölt metszeteket kétszer mostuk PBS-ben, száradás után a

sejtmagokat DAPI-val jelöltük. Az EGFR fehérje expresszió mértékének megállapítására az irodalomban is használt kategóriákat alkalmaztuk: 0: nem volt festődés; 1+: részleges membránjelzés; 2+: gyenge teljes membránjelzés; 3+: intenzív komplett membránfestődés a sejtek > 10%-ában.

Áramlási citometria

A sejteket 3 ml 0,05 % (w/v) tripszin, 0,02 % (w/v) EDTA oldat keverékével felválasztottuk a tenyésztőedény aljáról, 10 % FBS-ben szuszpendáltuk és háromszor mostuk (10 min, 600 x g) PBS oldatban (pH: 7,2). 1×10^6 sejtet 50 μ l PBS –BSA elegyben felvettünk és 10-20 μ g direkt jelzett anti EGFR monoklonális antitesttel (mAb 528) jelöltük 4 °C-on 1 órán keresztül. Jelölés után a sejteket háromszor mostuk PBS-ben és fixáltuk 500 μ l 1% formaldehid-PBS oldatban. A foszforilált EGFR méréséhez a sejteket először 10 μ g/mL EGF-al stimuláltuk 10 percig 37°C-on, majd 3,7% formaldehid-PBS-ben fixáltuk 30 percig. A fixált sejteket kétszer mostuk PBS-0,1M Tris-ben és 50 μ g/mL primer antitesttel (anti-phospho-EGFR, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) inkubáltuk, majd A488-kapcsolt GaMIg 0,1% TritonX-100, 0,1% BSA-PBS eleggyel jelöltük 1 órán át jégen. A sejteket ez után kétszer mostuk PBS-sel majd 300 ml 1% formaldehidben fixáltuk.

A receptor fehérje mennyiségének mérését FACScan áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) végeztük. Mintánként 20 000 sejt fluoreszcens jelét detektáltuk az FL-1 csatornában (készülékben a fluoreszcens molekulákat az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az emittált fényt egy 530 nm-es band pass szűrőn keresztül detektáltuk), lineáris módban. A mért eredményekből levontuk a jelöletlen minták mérésével meghatározott háttér fluoreszcencia intenzitásokat.

Western blot analízis és immunprecipitáció

A sejtlizátumot a sejtek PBS-sel történő mosását követően lízis puffer felhasználásával készítettük. A lízis puffer a sejtek teljes feltárására alkalmas, mely a következő összetevőkből állt: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 Complete Mini (Roche, Mannheim, Germany) proteáz inhibitor koktél tablettá/10 mL, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mM NaF. A lízis pufferrel való 10 perces jégen való inkubálást követően a sejtlizátumot centrifugáltuk. A vizsgálandó fehérjék molekuláris szintű kapcsolatának elemzéséhez immunprecipitációt alkalmaztunk, melynek során a sejtlizátumot 1 órán át 4 fokon a megfelelő antitestekkel inkubáltuk. ErbB1 ellen F4 (E3138, Sigma,

Schnelldorf, Germany) antitestet alkalmaztunk. Az immunoprecipitált fehérjéket Sepharose 4B Fast Flow Protein G gyöngyök (Sigma) felhasználásával, további 1 órás inkubálással kötöttük meg majd SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel választottuk szét molekulatömegük alapján és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránhoz kötött ErbB1 molekulát elsődlegesen az F4, a foszforilált tirozint a PY99-sc7020 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antitestekkel jelöltük meg a gyártó javaslatának megfelelő hígítást alkalmazva. A jelölt molekulák detektálására peroxidázzal konjugált egér elleni IgG-t és a kemilumineszcencia kimutatására kifejlesztet gyorsesztesztet (enhanced chemiluminescence kit, Amersham, Freiburg, Germany) alkalmaztunk.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mérések

A metszetekről Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) készítettük a felvételeket egy 63x (NA=1,4) olajimmerziós objektívvel. A FITC fluoreszcens festéket az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját egy 505-530 nm-es bandpass szűrőn keresztül detektáltuk. A Cy5 a He-Ne lézer 633 nm-es vonalával gerjesztettük, emisszióját egy 650 nm-es longpass szűrőn keresztül detektáltuk. A DAPI-t egy higanygőz lámpa UV emissziójával gerjesztettük, az emisszióját pedig (ugyanannak a konfokális térfogatnak a pásztázásával, amelynek pásztázásával a FITC és a Cy5 emisszióját detektáltuk) egy 390 nm-es dikroikus tükrön és egy 395 nm longpass szűrőn keresztül detektáltuk.

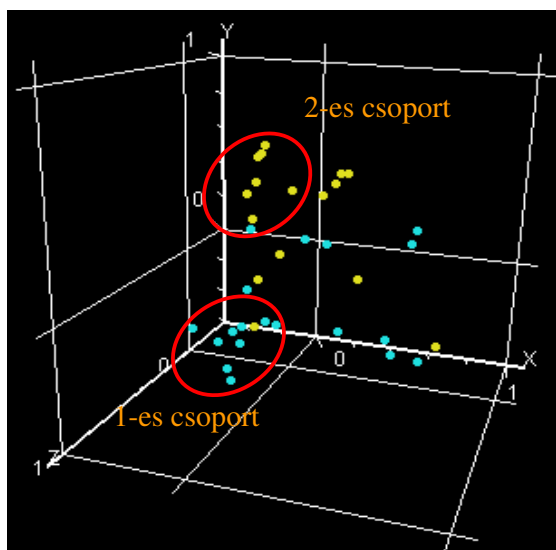
Eredmények

Malignus melanomák génexpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával

Kísérleteink során célunk volt primer melanomák és metasztázisok globális génexpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával, a génexpressziós változások és a daganatok klinikai viselkedése közötti kapcsolat elemzése.

A kísérleteinkhez az Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-t használtuk, 43 tumor (37 primer melanoma, 6 metasztázis) génexpressziós mintázatát elemeztük. A minták részletes klinikai adatait a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Az elemzéseinket a nyers fluoreszcencia intenzitási adatok többszörös normalizálása és minőségellenőrzése során kapott 25886 gént tartalmazó listán végeztük el. A 25886 transzkript expresszióját az ún. „Principal Component Analysis (PCA)” analízissel tanulmányoztuk. Az analízis lehetőséget ad a tumorok génexpressziós mintázatuk alapján történő csoportosítására a hasonló expressziós profillal rendelkező mintákat egy csoportokba rendezve. A 2. ábra szemlélteti a PCA elemzés eredményét, a daganatok két csoportra különültek el génexpressziós mintázatuk alapján.



2. Ábra Primer melanoma PCA analízisének eredménye 3D koordinátarendszerben ábrázolva. A pontok reprezentálják a melanoma mintákat, késsel az ulcerált felszínű tumorok, sárgával a nem ulcerált felszínű tumorok vannak jelölve. A pontok távolsága a minták génexpressziós mintázatának hasonlóságát mutatja. Piros vonallal vannak körülhatárolva a génexpressziós mintázat hasonlóság alapján egy csoportba tartozó léziók.

A háromdimenziós koordináta-rendszerben pontok reprezentálják az egyes melanoma mintákat, a pontok közötti távolság jelöli a tumor minták génexpressziós mintázatának hasonlóságát. Jól látható, hogy a 37 mintából 10 (1-es csoport) illetve 12 (2-es csoport) minta egymáshoz közel helyezkedik el két különálló csoportot alkotva, ami egyértelműen az egyes csoportokban expressziós profilok közötti hasonlóságot jelzi 25886 génre vonatkozóan.

A csoportokban lévő minták klinikai paraméter szerinti megoszlását vizsgálva, szignifikáns különbséget tudunk kimutatni a tumorok felszínének kifeléelyesedése (ulceráció) és a léziók csoportok közötti megoszlása között (Fisher teszt, $p < 0,001$).

Az 1-es csoport mintái egy kivétellel mind kifeléelyesedett felszínűek, míg a kettes klaszterbe tartozó minták felszíne egy mintától eltekintve nem kifeléelyesedett (2. ábra). A két csoport között 2846 gén expressziója szignifikáns eltérést mutatott ($p < 0,05$ „Volcano plot”, „Benjamini and Hochberg false discovery rate”). Az 1-es klaszter mintáiban a 2-es csoportba tartozó léziókhoz képest szignifikáns mértékben megnövekedett expressziójú gének közül, a 20 legnagyobb változási értékkel (fold change) rendelkező gének listáját a 6. táblázat tartalmazza. Az 1-es klaszter mintáiban csökkent expressziójú gének közül a 20 legkisebb „fold change” értékkel rendelkező géneket a 7-es táblázatban foglaltuk össze.

6. Táblázat

Az 1-es klaszter mintáiban szignifikáns mértékben megnövekedett expressziójú gének közül a 20 legnagyobb változási értékkel rendelkező gén.

Affymetrix azonosító	„Fold change” ^a	Gén szimbólum	Leírás	Ref.Seq azonosító
209875_s_at	22,94	SPP1, OPN	secreted phosphoprotein 1, osteopontin	NM_000582
212094_at	13,8		paternally expressed 10	XM_496907
214974_x_at	13,3	CXCL5	chemokine (C-X-C motív) ligand 5	NM_002994
223723_at	12,99	MFI2	antigen p97 (melanoma associated)	NM_005929
209504_s_at	11,47	PLEKHB1	pleckstrin homology domain containing	NM_021200
209859_at	9,326	TRIM9	tripartite motív-containing 9	NM_015163
228384_s_at	8,625	C10orf33	chromosome 10 open reading frame 33	NM_032709
209686_at	7,847	S100B	S100 calcium binding protein B	NM_006272
228494_at	7,82		CDNA FLJ37573 fis	
205334_at	7,643	S100A1	S100 calcium binding protein A1	NM_006271
221911_at	7,42	ETV1	ets variant gene 1	NM_004956
230831_at	7,001		FERM domain containing 5	NM_001031729
235911_at	6,853		hypothetical gene	XM_498955
231535_x_at	6,574	ROPN1	ropporin, rhophilin associated protein 1	NM_017578
202976_s_at	6,325	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3	NM_014899
205234_at	6,322	SLC16A4	solute carrier family 16, member 4	NM_004696
236599_at	6,233	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E	NM_006216
207012_at	6,192	MMP16	matrix metalloproteinase 16	NM_005941
225566_at	5,834	NRP2	neuropilin 2	NM_003872
206898_at	5,679	CDH19	cadherin 19, type 2	NM_021153

^aA mintacsoportok között kimutatott génexpressziós változás.

Az 1-es klaszter mintáiban a megnövekedett expressziójú gének közül a legnagyobb változást (22,94-szeres) az osteopontin (OPN) génnél figyeltünk meg. Szintén magasabb expressziós szintet detektáltunk a CXCL5, és MMP16 géneknél, melyek génexpressziós eltéréseit irodalmi adatok is alátámasztják. Érdekes jelenség, hogy a melanoma progresszióval összefüggő FGFR2 gén expresszió növekedéssel szemben, az általunk analizált 1-es klaszterbe tartozó rosszabb prognózisú melanomákban a gén csökkent expresszióját figyeltük meg, ugyanakkor a gén emelkedett mRNS szintje jellemezte a 2-es klaszter jobb prognózisú mintáit.

7. Táblázat

Az 1-es klaszter mintáiban a 2-es csoportba tartozó léziókhöz képest csökkent expressziójú gének közül a 20 legkisebb „fold change” értékkel rendelkező gének

Affymetrix azonosító	„Fold change” ^a	Gén szimbólum	Leírás	Ref.Seq azonosító
206177_s_at	0,0169	ARG1	arginase, liver	NM_000045
206642_at	0,0163	DSG1	desmoglein 1	NM_001942
213369_at	0,016	PCDH21	protocadherin 21	NM_033100
207720_at	0,0159	LOR	Loricrin	NM_000427
206276_at	0,0157	LY6D	lymphocyte antigen 6 complex	NM_003695
203638_s_at	0,0152	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	NM_000141
219936_s_at	0,0151	GPR87	G protein-coupled receptor 87	NM_023915
235272_at	0,015	SBSN	Suprabasin	NM_198538
220620_at	0,0145	CRCT1	cysteine-rich C-terminal 1	NM_019060
206595_at	0,014	CST6	cystatin E/M	NM_001323
206884_s_at	0,0138	SCEL	Sciellin	NM_003843
207324_s_at	0,0137	DSC1	desmocollin 1	NM_004948
203453_at	0,0136	SCNN1A	sodium channel	NM_001038
224329_s_at	0,0131	CNFN	Cornifelin	NM_032488
207908_at	0,013	KRT2	keratin 2	NM_000423
204734_at	0,0129	KRT15	keratin 15	NM_002275
219995_s_at	0,0127	ZNF750	zinc finger protein 750	NM_024702
206421_s_at	0,0124	SERPINB7	serpin peptidase inhibitor, clade B	NM_001040147
214599_at	0,0122	IVL	Involucrin	NM_005547
220414_at	0,0112	CALML5	calmodulin-like 5	NM_017422
206193_s_at	0,0075	CDSN	Corneodesmosin	NM_001264

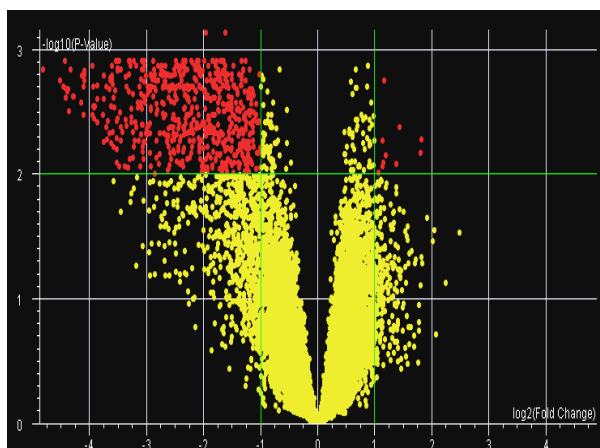
^aA mintacsoportok között kimutatott génexpressziós változás.

Melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő génexpressziós változások

További elemzéseinkhez a primer tumorokat klinikopatológiai tulajdonságaik alapján csoportokra osztottuk. Az egyes csoportokon belül az ún. „Volcano plot” elemzést alkalmaztuk, amely lehetőséget ad egy lépésben a minimum kétszeres expressziós különbséget mutató gének kimutatására úgy, hogy közben jelöli a szignifikáns mértékben eltérő expressziójú géneket is ($p < 0,05$, „Benjamini and Hochberg false discovery rate”). A statisztikai analíziseknél az egyes gének csoportokon belüli átlagintenzitási értékével dolgoztunk. Elemeztük a daganatok kor, nem, Breslow vastagság és Clark szint kategóriák szerinti megoszlásával, valamint a felszíni kifelélyesedéssel (ulceráció) és metasztázis

képzéssel összefüggő génexpressziós változásokat. Az egyes klinikopatológiai csoportok között szignifikánsan eltérő expressziójú géneket csak a metasztázis képzés és a daganatok felszínének kifekélyesedése alapján képzett csoportoknál tudtunk kimutatni. A két listában szereplő gének 90%-ban megegyeztek egymással. Ennek magyarázata, hogy a microarray vizsgálatokban tanulmányozott 37 primer melanoma minta közül a 2 éves követési idő alatt 7 metasztázist képzett lézió egyben ulcerált felszínnel is rendelkezett. Így a továbbiakban az elemzéseinket az ulcerációval összefüggő génexpressziós változásokra fókuszáltuk.

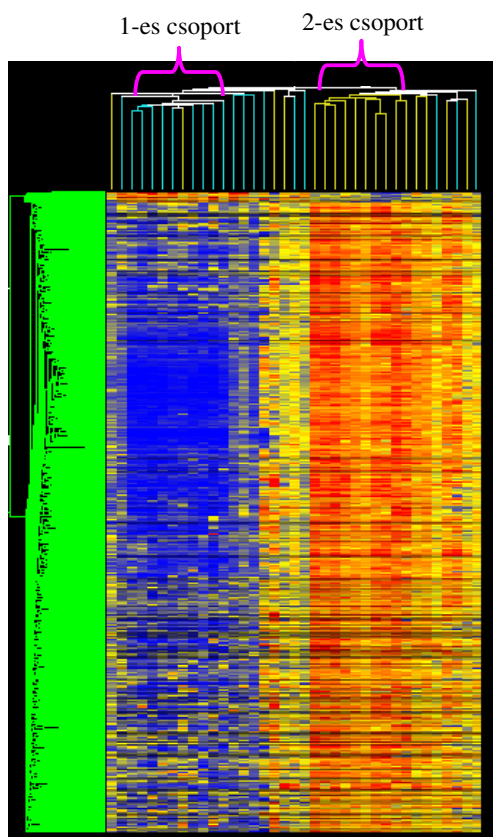
A daganatok kifekélyesedése rossz prognózissal társul, jelenléte nyirokcsomó áttétek kialakulásának valószínűségét növeli. A prognosztikus faktor fontosságát tükrözi a 2002-es TNM- beosztásba való bekerülése is. A daganatok felszínének kifekélyesedéséhez társuló szignifikáns mértékű génexpressziós változást 1095 génnél mutattunk ki „Volcano plot” elemzéssel (3. ábra).



3. Ábra „Volcano plot” elemzés: felszíni kifekélyesedés alapján csoportosított daganatok között szignifikáns mértékben eltérő gének azonosítása. A vízszintes zöld vonal a $p=0,05$ értéket, a függőleges zöld vonal a $2x$ génexpressziós szint változást jelöli. A különböző színű pontok a géneket reprezentálják, pirossal vannak jelölve a min. kétszeres expressziós különbséget mutató szignifikáns mértékben eltérő gének.

Meglepő, hogy a rosszabb prognózisú ulcerált mintákban a gének nagyrészeinek alulműködését figyeltük meg, ugyanakkor a gének megnövekedett expressziója jellemezte a jobb prognózisú mintákat. A jobb áttekinthetőség érdekében az 1095 transzkript mintánkénti expressziós mintázatát hierarchikus klaszter analízissel vizsgáltuk. A génlista valamint a daganatok klaszter analízisével a hasonló expressziós profillal rendelkező géneket és mintákat csoportokba rendeztük, az egyes minták expressziós mintázatának hasonlósági fokát dendogrammon ábrázolva. Az 4-es ábra szemlélteti a primer melanomák és az 1095 gén klaszter analízisének végeredményét. A primer léziók a génexpressziós mintázat hasonlósága alapján két nagy klaszterbe csoportosultak. A bal oldali klaszterbe tartozó 20 minta közül 16 kifekélyesedő felszínű, a jobb oldali klaszterbe 14 nem ulcerált felszínű és 3 ulcerált felszínű

minta tartozott. Mindkét klaszteren belül megfigyelhetünk egy-egy kisebb, szorosabb kapcsolatban lévő minta csoportot (az ábrán lila kapcsos zárójellel jelölve). A két kisebb csoport minta összetétele megegyezik a már korábban a teljes génlistán elvégzett PCA analízissel azonosított csoportok összetételével (2. ábra). A klaszterek közötti eltérő expressziójú gének (2846) és az ulcerációval kapcsolatos expressziós változást mutató 1095 génből 1056 gén átfedett egymással. Rosszabb prognózisú mintákban az 1095 génből 1021-et a génexpresszió csökkenése jellemezte, míg ugyanezen gének megemelkedett génexpressziós szintjét figyeltük meg a jobb prognózisú mintákban.



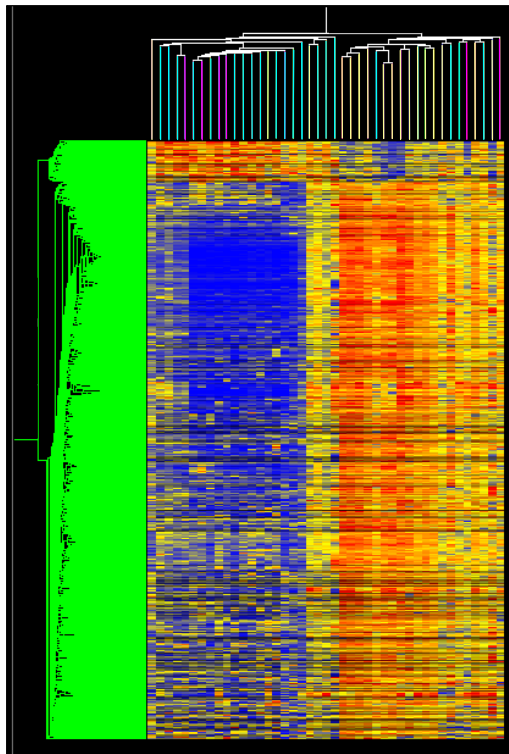
4. Ábra Primer melanoma minták hierarchikus klaszter analízise, az ulcerációval összefüggő expressziós változást mutató 1095 gént tartalmazó listán. Piros színnel a megemelkedett, kék színnel a csökkent, sárgával a normál génexpressziós szint van ábrázolva. A fenti dendrogram mutatja a minták hasonlósági fokát. A dendrogramon az ulcerált felszínű mintákat kék, míg a nem ulcerált felszínű minták sárga függőleges vonal jelzi. A lila kapcsos zárójelek a nagy klasztereken belüli szorosabb kapcsolatban lévő minta csoportot mutatják.

Melanoma metasztázisok génexpressziós mintázata

Hat melanoma metasztázis génexpressziós mintázatát elemeztük microarray technikával. T-teszttel vizsgáltuk a primer melanomák és a metasztázisok közötti génexpressziós különbségeket. Nem találtunk szignifikáns eltérést a metasztázisokban a primer léziókhöz képest. Ez azzal magyarázható, hogy mind a primer tumoroknál mind a metasztázis melanomáknál az egyes léziók expressziós mintázata eltér egymástól, nem egységes. Mivel a program a statisztikai elemzéseknél a gének csoporton belüli átlagintenzitásával számol, így a konkrét különbségek nem kerülnek felszínre, ezért a metasztázisokat klaszter elemzéssel hasonlítottuk a primer melanomákhoz az ulcerációval összefüggő génlista alapján (1095 gén).

Megfigyeltük, hogy a metasztázisok (dendogrammon lila színnel jelölve) közül négy génextpressziós mintázata szoros kapcsolatban áll a rossz prognózisú primer melanomák mintázatával, mind a négy nyirokcsomó metasztázis. A négy metasztázisban, a primer léziókhöz hasonlóan, a vizsgált gének nagyrésze csökkent expressziós szinttel rendelkezett (5. ábra). A további két, után metasztázis expressziós profilja a jobb prognózisú melanomák expressziós mintázatával mutat hasonlóságot.

A 6. ábra alapján elmondhatjuk a rossz prognózissal jellemezhető primer melanomák génextpressziós mintázata hasonló a nyirokcsomó metasztázisok génextpressziós profiljához.



5. Ábra Primer melanoma és melanoma metasztázis minták klaszter diagrammja az ulcerációval összefüggő 1095 gén lista szerint. A dendogrammon kék függőleges vonal az ulcerált, sárga a nem ulcerált, lila a metasztázis melanoma mintákat jelzi.

A fenti analízisekkel kapott génlistákon kívül az 1095 gén intenzitásértékeinek átlaga alapján meghatároztuk a két klaszterben a legmagasabb fluoreszcencia intenzitási értékkel rendelkező (10-10) géneket is (8-9. táblázat).

A rosszabb prognózisú csoportba tartozó mintákban, hasonlóan a PCA analízis eredményéhez, a legmagasabb intenzitási értéket az osteopontin (OPN) génnél figyeltünk meg. Megnövekedett expressziós szintet detektáltunk továbbá a melanoma antigén 6, az interleukin 8 és CXCL5 géneknél, expressziós értékeinek növekedését melanomában számos irodalmi adat is alátámasztja. A jobb prognózisú melanomákban a legnagyobb intenzitási értéket a defensin beta, a keratin 16 és az IL1F7 géneknél mutattunk ki.

8. Táblázat

A rossz prognózisú melanomákban a legmagasabb fluoreszcencia intenzitással rendelkező gének

Affymetrix azonosító	Átlagos log intenzitási érték	Gén szimbólum	Leírás
204475_at	4,444	CLG	matrix metallopeptidase 1
212092_at	4,811	PEG10	paternally expressed 10
203561_at	5,185	CD32	Fc fragment of IgG
223723_at	6,217	MTF1	antigen p97 (melanoma associated)
232010_at	6,802	KIAA1263;	folistatin-like 5
214612_x_at	6,971	MAGE6	melanoma antigen family A, 6
202859_x_at	8,883	IL8	interleukin 8
209504_s_at	9,109	KPL1	pleckstrin homology domain
214974_x_at	10,82	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
209875_s_at	11,82	OPN	secreted phosphoprotein 1

9. Táblázat

A jobb prognózisú melanomákban a legmagasabb fluoreszcencia intenzitással rendelkező gének

Affymetrix azonosító	Normalizált átlagos log intenzitási érték	Gén szimbólum	Leírás
209772_s_at	4,291 (1,497 to 8,303)	CD24	CD24 molecule
229103_at	4,303 (0,549 to 11,79)	WNT3	wingless-type MMTV member 3
232170_at	4,384 (0,347 to 41,8)	NICE-2	S100 calcium binding protein A7A
209905_at	4,448 (1 to 10,52)	HOX1	homeobox A9
211906_s_at	4,604 (0,938 to 14,4)	PI11	serpin peptidase inhibitor
239430_at	4,622 (1 to 27,54)	IGFL1	IGF-like family member 1
221470_s_at	4,631 (0,264 to 12,21)	IL1F7	interleukin 1 family, member 7 (zeta)
227736_at	5,003 (0,787 to 37,37)	UNQ1833	chromosome 10 open reading frame
209800_at	5,981 (0,645 to 15,47)	KRT16	keratin 16
207356_at	9,004 (0,313 to 165,9)	DEFB4	defensin, beta 4

A gének funkcionális analízise

További elemzéseinkben vizsgáltuk a melanoma minták felszíni kifehélyesedésével összefüggő szignifikáns mértékű expressziós eltérést mutató gének (1095) sejt életében betöltött szerepét az interneten hozzáférhető „Ingenuity Pathway Analysis 5.01 (IPA) és Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID)” programokkal. A programok lehetőséget adnak a különböző jelátviteli útvonalak érintettségének vizsgálatára, különböző funkciókban szerepet játszó komplex molekuláris hálózatok azonosítására.

Az analízis első lépéseként az agresszív viselkedésű melanomákban megemelkedett expressziós szinttel rendelkező gének jelátviteli útvonalakban betöltött szerepét vizsgáltuk DAVID programot használva. A módszer nagy előnye, hogy az összes jelenleg használt stizgnalizációs útvonalat tartalmazó adatbázisban keresi a gének funkcióját. A fokozott expressziót mutató 74 génből a DAVID program a gének Affymetrix kódja alapján 67 gént azonosított, melyből 22 gén tartozik az ismert jelátviteli útvonalakhoz (KEGG), az adatokat a 10-es táblázatban foglaltuk össze. Az analizált gének többsége különböző receptor mediált jelátviteli folyamatokban játszik szerepet pl: JAK-STAT, TGF-béta és a Toll-like receptorok

által szabályozott molekuláris hálózatokban. A citokin útvonalhoz a listából több gén is tartozik: CCL3L3, CCR1, EPOR.

10. Táblázat

Az agresszív viselkedésű melanómában megemelkedett expressziós szinttel rendelkező gének funkcionális azonosítása

Affymetrix azonosító	Gén név	KEGG szignalizációs útvonal
205099_s_at	chemokine (c-c motif) receptor 1	Citokin-citokin kölcsönhatás
216958_s_at	isovaleryl coenzyme a dehydrogenase	Valin, Leucin, Isoleucin degradáció
206129_s_at	arylsulfatase b	Glükózaminoglikán degradáció
1554638_at, 203651_at	zinc finger, five domain containing 16	TGF-beta szignalizációs útvonal
205119_s_at	formyl peptide receptor 1	Neuroaktív ligand-receptor kölcsönhatás
201660_at, 201661_s_at	acyl-coa synthetase long-chain family member 3	Zsír-sav metabolizmus, adipocitokin szignalizációs útvonal
224341_x_at	toll-like receptor 4	Toll-like receptor szignalizációs útvonal
211429_s_at	serpin peptidase inhibitor, clade a (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Komplement és Koagulációs kaszkád
223679_at	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kda	WNT szignalizációs útvonal, Fokális adhézió, Adherens junction, Tight junction
202898_at	syndecan 3 (n-syndecan)	ECM-receptor kölcsönhatás, Sejt adhéziós molekula
221489_s_at	sprouty homolog 4 (drosophila)	JAK-STAT szignalizációs útvonal
235238_at	shc (src homology 2 domain containing) family, member 4	Fokális adhéziós, Natural killer sejt mediálta citotoxicitás, Inszulin szignalizációs útvonal
205114_s_at	chemokine (c-c motif) ligand 3	Citokin-Citokin receptor kölcsönhatás, TOLL-like receptor szignalizációs útvonal
204044_at	quinolinate phosphoribosyltransferase	Nikotinamid metabolizmus
215054_at, 37986_at	erythropoietin receptor	Citokin-Citokin receptor kölcsönhatás, JAK-STAT szignalizációs útvonal, Hematopoézis
1555772_a_at	cell division cycle 25a	Sejt ciklus
209875_s_at	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein i, early t-lymphocyte activation 1)	Sejt kommunikáció, Fokális adhézió, ECM-receptor kölcsönhatás
201272_at	aldo-keto reductase family 1, member b1 (aldose reductase)	Fruktóz és mannóz metabolizmus, Galaktóz metabolizmus, Piruvát metabolizmus
202043_s_at	spermine synthase	Urea ciklus, Arginin and Prolin metabolizmus, Béta-alanin metabolizmus
222240_s_at	myo-inositol 1-phosphate synthase a1	Streptomycin bioszintézis, Inozitol foszfát metabolizmus
202954_at	ubiquitin-conjugating enzyme e2c	Ubiquitin mediált proteolízis

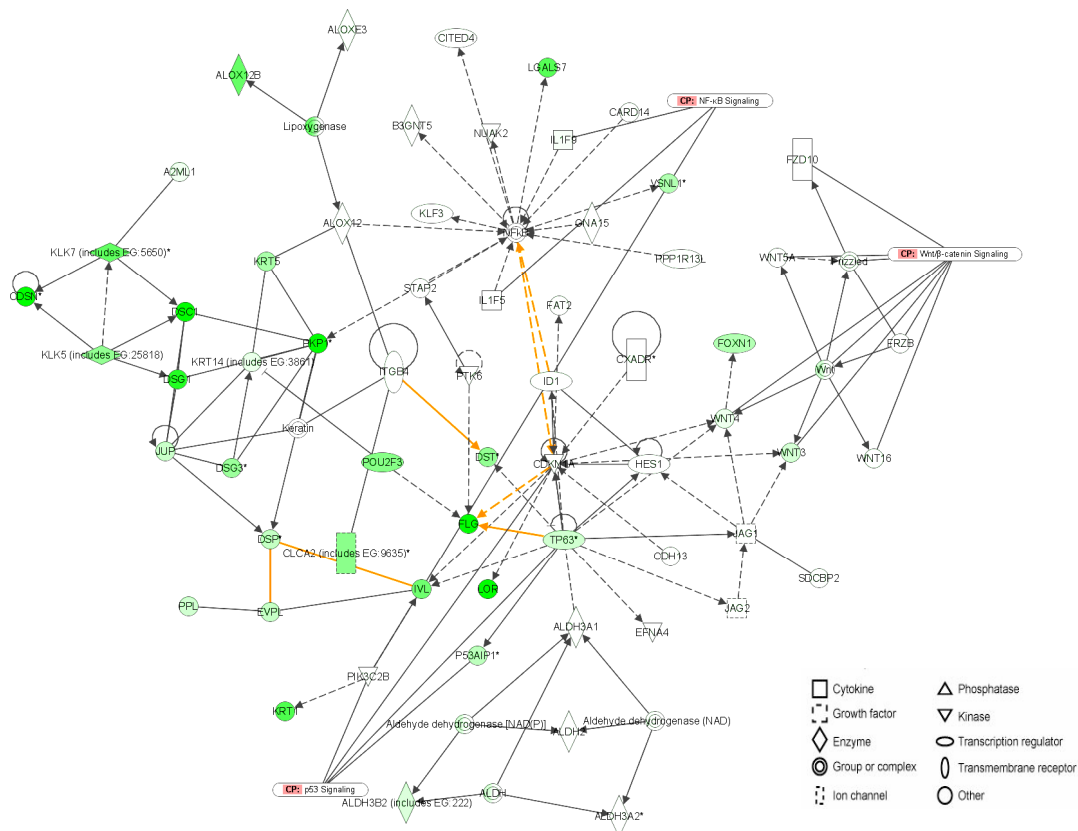
11. Táblázat

Csökkent expressziójú gének funkcionális csoportosítása

Bőr- és szőrfejlődési funkció, dermatológiai betegségek	A2ML1, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, B3GNT5, CARD14, CDSN, CITED4, CLCA2, DSC1, DSG1, DSG3, DSP, FLG, GNA15, IL1F5, IL1F9, ITGB4, JUP, KLF3, KLK5, KLK7, KRT5, KRT14, LGALS7, NFkB, NUAQ2, PKP1, POU2F3, PPP1R13L, PTK6, STAP2, VSNL1
Sejt-és szerv fejlődés, bőr- és szőrfejlődési funkció	ALDH, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B2, CDH13, CDKN1A, CXADR, DST, EFNA4, EVPL, FAT2, FOXN1, FRZB, FZD10, HES1, ID1, IVL, JAG1, JAG2, KRT1, LOR, P53AIP1, PIK3C2B, PPL, SDCBP2, TP63, Wnt, WNT3, WNT4, WNT16, WNT5A
Daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek	Akt, AKTIP, ANK3, BTC, CDCP1, CLDN1, FABP5, FCER1A, Fgf, FGF11, Fgfr, FGFR2, FGFR3, FLNB, G alpha1, GJB2, GRB7, Ige, INADL, KRT10, MAF, MAFB, MAGI1, NTRK2, OCLN, Pdgf, PLC gamma, PTPRF, S100A7, SDC1, SPINT2, ST14, TIAM1, TJP2, VAV3
Génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat	Ap1, BAG1, CD36, CIDEA, CRABP2, CST6, CTSL2, DACH1, DUSP1, EPHA4, EPHA/B, EPHB3, EPHB6, FOSL2, GJA1, HR, IL1, IL1F7, JINK1/2, Mapk, MAPK13, ME1, N-cor, PLAGL1, Rar, RGS13, RORA, Rxr, RXRA, SPRR1B, THBD, THRB, TPD52L1, VDR, VitaminD3-VDR-RXR
Gyógyszer metabolizmus, lipid metabolizmus, kis molekulák	AKR1C2, COL7A1, DEGS1, EDN1, EGFR, EGR3, GDA, GPC1, LMO7, Mek, Mmp, MMP28, MYO6, OMD, Pak, PAK6, PALLD, PAWR, PDGF BB, PDLIM1, PDLIM2, Pka, PLC, PLEKHA1, PTGER3, PTGS1, PTPN3, SERPINB2, SH2D3A, SLC2A1, Tgf beta, TPSAB1, ZFP36L1
Sejt fejlődés, sejt osztódás, kardiovaszkuláris rendszer fejlődés és funkció	ACVR2A, ASPN, ASS1, BLNK, BMP2, BTG2, CSDA, Cyclin A, Cyclin E, DCN, DLX5, E2f, FBXW7, Hdac, HLA-DQB2, HOPX, ID3, KLF4, KLF5, KLF10, LAMA3, LIMK2, MAP3K6, MAP3K8, NFATC3, P38 MAPK, PPAP2C, Rap1, Ras, RASSF5, Rb, SMAD1, TOB1
Inflamatorikus betegségek	14-3-3, ARHGEF4, CA2, CA12, CA13, CA6, CALML5, CAMK1D, Cbp/p300, CITED2, Cyclin B, DUSP14, ETS2, GNAI1, GPSM2, HOXA9, HPGD, Hsp70, Hsp90, Jnk, JUNB, LTB4R, NEB, NR3C2, PBX1, PIM1, REL, SERPINB3, SFN, STAT, TACC2
Karbonhidrát metabolizmus, kis molekulák	ARG1, ARHGEF5, BCL11B, CEBPA, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1, CYP4X1, F2RL1, GATA3, Gsk3, Histone h3, HMGCR, HSD11B1, IDE, IKK, Insulin, KLK8, LDL, NDRG2, NF-κB, Nfat, NOD2, PGDS, Pkc(s), PRSS2, PRSS3 SMPDL3A, STAT5a/b, TGM1, TNFSF10, VAMP8, WWC1
Sejt morfológia, sejt organizáció, sejt-sejt kölcsönhatás	ABLIM1, Actin, ATYPICAL PROTEIN KINASE C, BDKRB2, Cofilin, DAPP1, ENaC, EPS8L1, EPS8L2, GPLD1, HOMER2, Integrin, ITGA2, JUB, NDFIP2, PARD3, PI3K, Pld, PP2A, PPP2R2C, PPP2R3A, PRSS8, PVRL1, PVRL4, RHOD, SCNN1A, Sos, SSH3, TCR, UTRN, VAV
Gyógyszer metabolizmus, lipid metabolizmus, kis molekulák	ACSBG1, AHNAK, ANXA2, Ca2+, CCR4, CLEC3B, CYB5A, GPC1, HGS, HPCAL1, IL18, IL18RAP, IVL, KRT10, LOR, MAL2, MYO5B, NMUR2, PKC ALPHA/BETA, PLG, PTGER3, PTGS2, SBSN, SERPINB2, SERPINB12, SH3GLB2, SPINK5, TACR1, TNFRSF25, TPD52, TRIM3, TRPM4

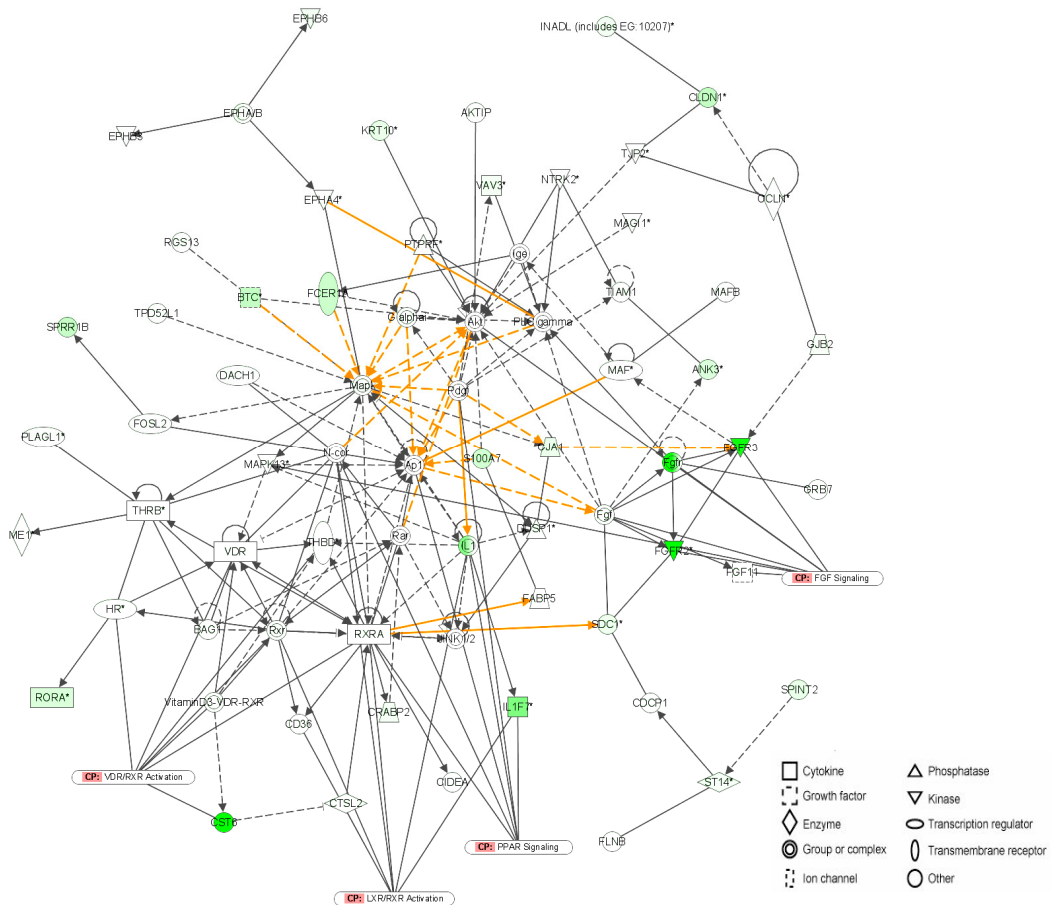
A legmagasabb fluoreszcencia intenzitási értékkel rendelkező osteopontin gén a fokális adhézió, sejt-kommunikáció és extracelluláris mátrix kölcsönhatását szabályozó folyamatokban vesz részt. Az adherens kapcsolatokra az osteopontin génen kívül az shc, syndecan 3 illetve a catenin is hatást gyakorolnak.

Az 1021 alulműködő gént funkciójuk alapján az IPA program 26 molekuláris hálózatba rendezett. A legtöbb gént magába foglaló első tíz csoportot, a 11-es táblázatban foglaltuk össze. Az IPA adatbázisa az eddig ismert összes gén-gén kölcsönhatást, a gének jelátviteli és funkcionális folyamatokban betöltött szerepét tartalmazza, és ezen információk alapján alkot csoportokat a génlistán szereplő génekből. A különböző funkciók kialakításában, fenntartásában számos jelátviteli folyamat együttesen működik közre. A csoportokban szereplő gének a bőr- szőrfejlődésben, a sejt-ciklus, sejtosztódás, sejt-sejt interakció, a sejtmozgást szabályozó valamint a kardiovaszkuláris rendszer fejlődésében szerepet játszó útvonalakhoz tartozik, továbbá különböző metabolikus folyamatok résztvevői.



6. Ábra Bőr- és szőrfejlődési funkció; Sejt-és szervfejlődés, bőr- és szőrfejlődési funkció dermatológiai betegségek csoportba tartozó gének hálózata. Zöld szín a gének alulműködését, a szín erőssége a „fold change” érték növekedését jelöli. A folytonos vonallal a direkt hatást, a szaggatott nyíllal a gének indirekt interakcióját ábrázoltuk.

A táblázatban szereplő első négy funkcióban (bőr- és szőrfejlődési funkció; sejt-és szervfejlődés, bőr- és szőrfejlődési funkció dermatológiai betegségek; daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek; génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat) résztvevő gének kölcsönhatását részletesen is tanulmányoztuk. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a gének hálózatát két ábrán tüntettük fel. A 6-es ábrán látható az első két funkcióban résztvevő gének kapcsolata, a 7-es ábrán a harmadik és negyedik csoportban lévő interakciók láthatóak. Az IPA analízissel kimutattuk, hogy a gének többsége elsősorban a p53, Nf-kB, WNT/ β -catenin kaszkádkhoz kapcsolódik. A hálózatban a CDKN2A, TP63, NFkB, gének játszanak központi szerepet. Az általunk vizsgált gének közül a fent említettekkel kapcsolatban lévő gének az ulcerált felszínű, rosszabb prognózisú daganatokban csökkent expressziós szinttel rendelkeznek, ugyanakkor megnövekedett expressziójuk jellemzi a jobb prognózisú daganatokat.



7. Ábra Daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek; Génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat betegségek csoportba tartozó gének hálózata. Zöld szín a gének alulműködését, a szín erőssége a „fold change” érték növekedését jelöli. A folytonos vonallal a direkt hatást, a szaggatott nyíllal a gének indirekt interakcióját ábrázoltuk.

Daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek; génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat betegségek csoportba tartozó gének az FGF, PPAR jelátviteli útvonalakban, továbbá az LXR/RXR és VDR/RXR aktivációban játszanak szerepet, hatás gyakorolva a MAP és AKT kináz kaszkádokra.

Array CGH adatok és a génexpressziós változások

Kíváncsiak voltunk, hogy a rosszabb prognózisú melanomákban a gének nagy részénél tapasztalt csökkent kifejeződés társul-e az adott gének deléciójával, illetve az emelkedett génexpresszió milyen genom eltérésekkel asszociálódik. Tizenegy primer és 2 melanoma metasztázisnál tudtuk összehasonlítani az aCGH és génexpressziós adatokat. Bussey KJ és munkatársai⁵⁶ által kifejlesztett, az interneten hozzáférhető Matchminer programmal lehetőség nyílt, hogy a két különböző array platformot összehasonlítsuk, a közös géneket azonosítsuk. A Matchminer program az 1095 génből 593 gén esetében ismert fel olyan forgalomban lévő BAC klónt, melyek az Affymetrix array-en található génspecifikus szakaszokat fedik le. Ezek közül, az általunk használt aCGH platform a 16 BAC klónt tartalmaz (12. táblázat).

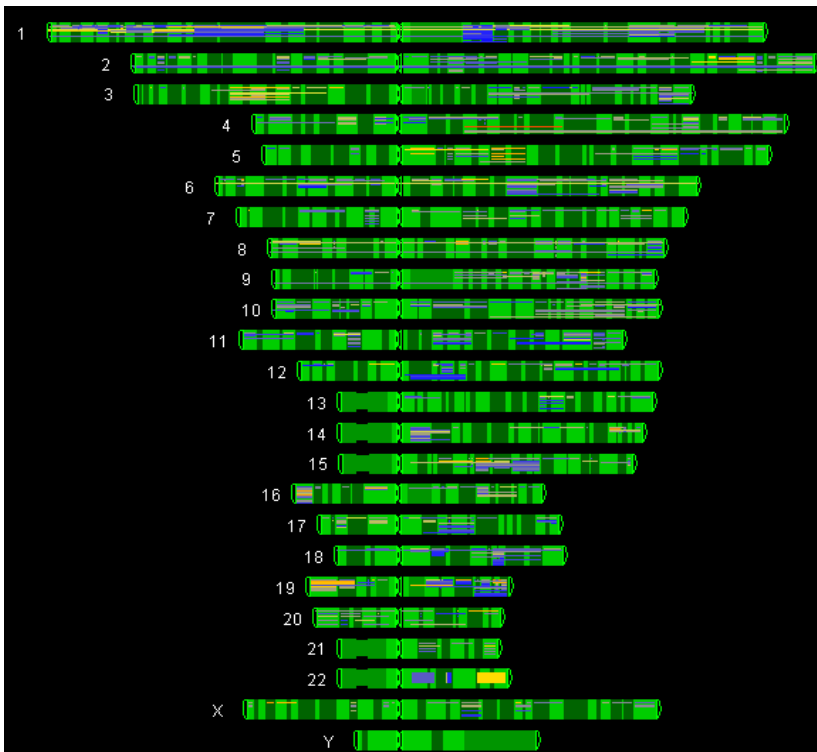
A korábban leírt gének kromoszómális lokalizációját a 7-es ábrán tüntettük fel. A megemelkedett expressziós szinttel rendelkező gének közül az általunk használt CGH array csak a SULF-1 gént reprezentáló RP11-120N14 BAC klónt (8q13.2) tartalmazta. A SULF-1 génnél három, a rossz prognózisú csoportba tartozó mintában mutattunk ki a küszöbérték feletti ($\log_2 > 0,25$) $\log_2 = 0,3$ értékeket (13-es táblázat, zölddel jelölve), azonban ez az érték kicsi ahhoz, hogy a kromoszómális szakasz egyértelmű többletét jelentse. Mivel a CGH sejtpopulációk DNS-ében található átlag kópiaszámról nyújt információt, a 8q13.2 szakasz eltéréseinek pontosabb vizsgálatához FISH szükséges.

A csökkent expressziójú gének többsége az egyes kromoszómán az 1p21-22.3, 1p36, 1q21 1q36 régiókon, továbbá a 6p21, 6q21-6q23 valamint a 10q, 11q, 15q22 szakaszokon lokalizálódik.

A jobb áttekinthetőség érdekében a 16 gén primer és metasztázis mintákban kimutatott expressziós mintázatát a 8. ábrán tüntettük fel. A bal oldali klaszterbe tartozó melanomákban a SULF-1 kivételével a gének alulműködését, míg a jobb oldali klaszterbe tartozó daganatokban a gének megnövekedett expresszióját detektáltuk. A bal oldali klaszterbe tartozó léziók közül nyilakkal jelöltük meg azokat a mintákat, melyekre array CGH adat állt a rendelkezésünkre, a 16 gén CGH adatait a 13. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban

zölddel vannak kiemelve a DNS többletet jelölő ($\log_2 > 0,25$) értékek, pirossal a $\log_2 < -0,25$ DNS hiányt jelző intenzitási adatok.

A szulfatáz-1 gén három mintában kimutatott $\log_2 = 0,3$ körüli értékei mellett, a 6-os mintában az EGFR génnél figyeltünk meg a küszöb érték feletti intenzitási értéket ($\log_2 = 0,8$), mely EGFR extra kópiára hívja fel a figyelmet, de nem utal nagymértékű amplifikációra. A daganatból készült lenyomat preparátumon az EGFR eltérését egyedi sejtek szintjén is vizsgáltuk FISH-el.

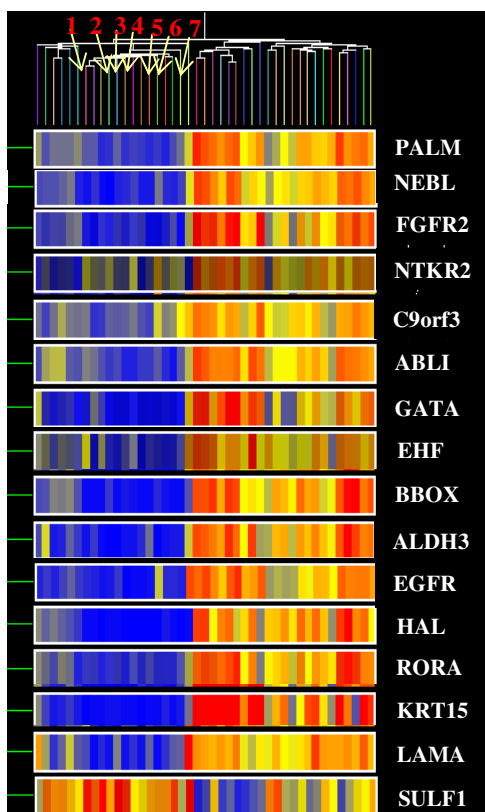


7. *Ábra* 1095 gén kromoszómális lokalizációja. A zöld szín árnyalatai a kromoszóma sávokat jelzik. A rossz prognózisú mintacsoport átlagintenzitás értékeinek megfelelően kékek a csökkent expressziójú, narancs-piros színnel a megnövekedett expressziójú gének vannak jelölve.

A szulfatáz-1 gén három mintában kimutatott $\log_2 = 0,3$ körüli értékei mellett, a 6-os mintában az EGFR génnél figyeltünk meg a küszöb érték feletti intenzitási értéket ($\log_2 = 0,8$), mely EGFR extra kópiára hívja fel a figyelmet, de nem utal nagymértékű amplifikációra. A daganatból készült lenyomat preparátumon az EGFR eltérését egyedi sejtek szintjén is vizsgáltuk FISH-el. A tumorsejtek 39%-ában kismértékű amplifikációt, 2%-ában nagymértékű amplifikációt mutattunk ki a 7-es kromoszóma poliszómiájával asszociálódva. A 6-os mintában kimutatott EGFR gén többlete az expressziós szint növekedését vonta maga után (8. ábra).

12. Táblázat

Affymetrix és BAC alapú array CGH közös gének



Affymetrix azonosító	Lokalizáció	Gén szimbólum	BAC klónok
218736_s_at	1p21.2	PALMD	RP11-138K16
201983_s_at	7p11.2	EGFR	RP11-14K11
201984_s_at	7p11.2	EGFR	RP11-14K11
212353_at	8q13.2	SULF1	RP11-120N14
212354_at	8q13.2	SULF1	RP11-120N14
208228_s_at	10q26.1	FGFR2	RP11-7P17
221796_at	9q21.33	NTRK2	RP11-20B20
212848_s_at	9q22.32	C9orf3	RP11-54O15
203962_s_at	10p12.31	NEBL	RP11-34I5
209602_s_at	10p14	GATA3	RP11-197K17
209604_s_at	10p14	GATA3	RP11-197K17
210461_s_at	10q25.3	ABLIM1	RP11-32I9
200965_s_at	10q25.3	ABLIM1	RP11-32I9
219850_s_at	11p13	EHF	RP11-3E12
205363_at	11p14.2	BBOX1	RP11-1L12
204942_s_at	11q13.2	ALDH3B2	RP11-160L9
206643_at	11q23.3	HAL	RP11-69E3
210479_s_at	15q22.2	RORA	RP11-18B17
210426_x_at	15q22.2	RORA	RP11-18B17
204734_at	17q21.2	KRT15	RP11-29C11
203726_s_at	18q11.2	LAMA3	RP11-59E12

8. Ábra 16 gén expressziós mintázata primer és metasztatikus melanomákon. A dendrogrammon lévő nyilak és a számok a 13-as táblázatban szereplő mintákat jelölik.

13. Táblázat

A rossz prognózisú minták CGH adatai. Zölddel a DNS többletet, piros színnel a DNS hiányt jelző \log_2 intenzitási értékek vannak jelölve.

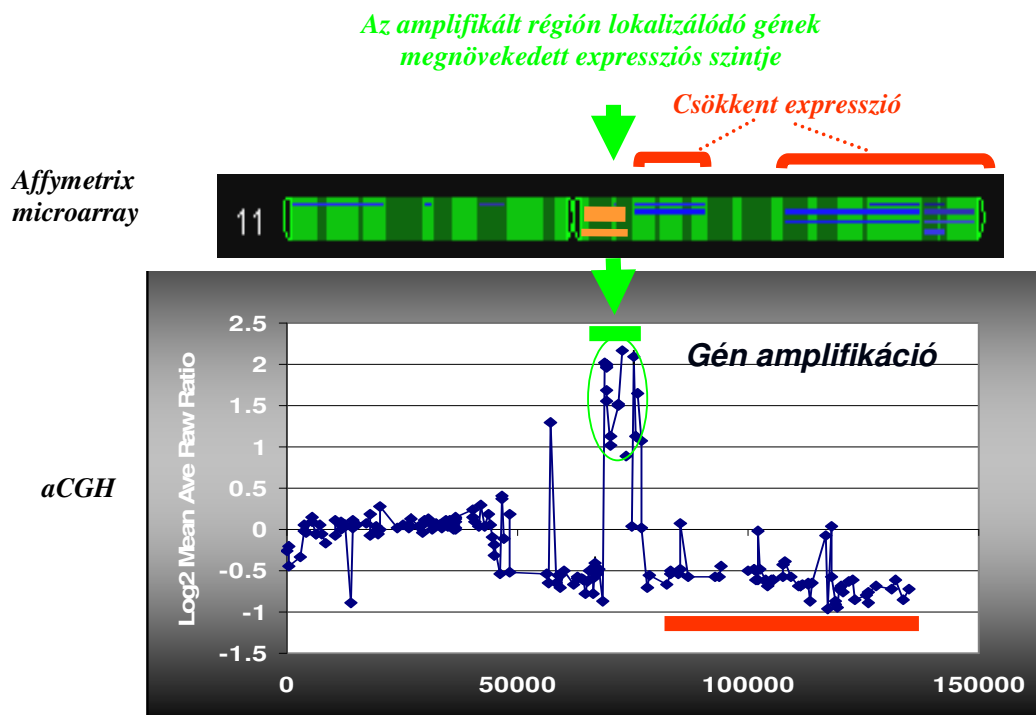
Gének	BAC klónok	1 aCGH	2(meta) aCGH	3 (meta) aCGH	4 aCGH	5 aCGH	6 aCGH	7 aCGH
PALMD	RP11-138K16	-0,0189	0,12151	-0,04281	0,03468	n,d	-0,09032	0,01041
EGFR	RP11-14K11	0,05310	-0,0485	-0,13044	0,03075	0,0084	0,838463	-0,1371
SULF1	RP11-120N14	-0,0513	0,39204	-3,00E-06	0,08885	-0,0722	0,359636	0,27079
FGFR2	RP11-7P17	0,10462	-0,0983	-0,00128	-0,03499	-0,0535	-0,08305	-0,0703
NTRK2	RP11-20B20	0,0468	0,37256	-0,04627	-0,08593	-0,2240	-0,01889	0,01846
C9orf3	RP11-54O15	0,0950	-0,0015	-0,04562	-0,03274	-0,2174	-0,03941	-0,0917
NEBL	RP11-34I5	-0,0918	0,03703	-0,03545	-0,10658	-0,1085	-0,08338	0,0310
GATA3	RP11-197K17	0,05507	-0,0092	-0,02086	-0,28766	0,0087	-0,10842	-0,0618
ABLIM1	RP11-32I9	0,04848	0,12280	-0,05952	-0,07279	-0,0195	-0,10844	0,0288
EHF	RP11-3E12	-0,0749	-0,1073	0,00209	0,11481	0,0290	-0,07648	0,0097
BBOX1	RP11-1L12	0,00807	0,07016	-0,08489	-0,09927	-0,0066	-0,07368	0,0081
ALDH3B2	RP11-160L9	0,17489	0,08810	0,00588	-0,20791	-0,0502	-0,09967	0,0655
HAL	RP11-69E3	-0,0085	-0,0096	0,31143	-0,1091	-0,0167	-0,02267	0,2580
RORA	RP11-18B17	-0,0342	0,05428	-0,06373	-0,27257	-0,0472	0,393917	-0,5330
KRT15	RP11-29C11	0,15355	0,1098	0,01611	0,16611	-0,0301	-0,15824	0,3902
LAMA3	RP11-59E12	0,02813	-0,1698	-0,04633	0,01862	0,07191	-0,43958	0,0186

Három mintában detektáltunk $\log_2 < -0,25$ intenzitási értéket. Az irodalomban a heterozigóta deléciónak megfelelő $\log_2 = -0,5$ értéket a 6-os mintában a LAMA3 gént kódoló 18q11.2 és a 7-es mintában a 15q22.2 (RORA) szakaszokon figyeltünk meg.

A többi mintában nem tudtunk kimutatni a vizsgált szakaszokon DNS hiányt, a gének expresszió csökkenésének hátterében valószínű nem a kromoszómális szakasz vesztese áll.

A génkópiaszám változás génextpresszióra gyakorolt hatását szemlélteti a 9-es ábra. Egy noduláris melanómában a 11-es kromoszómán kimutatott, a 11q szakaszt érintő génamplifikáció az itt lokalizálódó gének megnövekedett expresszióját eredményezte.

A 11qtert érintő deléció, a gének expressziójának csökkenését vonta maga után, a normál kópiaszámú daganatok expressziós szintjéhez képest.



9. Ábra Egy noduláris primer lézió 11-es kromoszóma Affymetrix és aCGH eredményei. Az aCGH profil a 11q többletét és a 11qter delécióját ábrázolja. A kromoszómális szakaszokon a narancs színnel vannak jelölve megnövekedett expressziójú gének, a kékszín a csökkent expresszióra utal.

Taqman Low Density Array (TLDA) analízis

A microarray eredményeinket 35 primer melanoma mintán qPCR alapú Taqman Low Density Array alkalmazásával ellenőriztük. Kísérleteink során a microarray analíziseink adataiból kiválasztott 65 gén, továbbá 29 az irodalomban már leírt, a melanoma progresszióval

összefüggésbe hozható gént tartalmazó TLDA-n végeztük el, kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és β -actin géneket alkalmaztunk. A qPCR reakció 7 gén esetében konzekvensen egyik mintában sem volt sikeres. A qPCR eredmények jó korrelációt mutatnak a microarray adatokkal. QPCR-al 47 génnél figyeltünk meg az ulcerációval összefüggő minimum kétszeres expressziós változást, ez a változás 25 génnél volt szignifikáns mértékű (14. táblázat).

14. Táblázat

QPCR-al kimutatott a melanoma ulcerációval összefüggő génexpressziós változások

Gén szimbólum	"Fold change" ^a	Gén szimbólum	"Fold change" ^a
IL8	119,2	EGFR	0,196
CDC25A	7,07	EPS8L2	0,178
AKAP12	6,805	SDC1	0,167
GPRC5B	4,618	CCL8	0,157
STC1	4,086	ITGB4	0,153
CTNNB1	2,878	ICAM1	0,137
MMP1	2,801	FGFR3	0,128
WNT2	2,647	MMP16	0,124
MYEF2	2,627	EFNA2	0,12
CXCL2	2,46	ARHGEF4	0,117
TP73L	2,204	PERP	0,0933
JUP	2,201	RAB25	0,0825
CCL3L3	2,166	FPR1	0,0811
CD207	0,492	CCR1	0,0761
CNNC	0,46	KLK5	0,068
RHOJ	0,418	CASP14	0,0646
FOS	0,411	CXADR	0,0627
MYC	0,411	KLK11	0,0586
TGFB1	0,39	KLF4	0,0532
ARHGAP8	0,346	NCAM1	0,0474
CXCL11	0,314	FGFR2	0,0455
TBX2	0,293	CTSL2	0,0448
LPHN2	0,254	CST6	0,0176
CDH2	0,253		

^aA mintacsoportok között kimutatott génexpressziós változás

A két melanoma csoport között legnagyobb expressziós szintbeli változást az interleukin 8 gén esetében figyeltünk meg (119-szoros).

EGFR és 7-es kromoszóma eltéréseinek vizsgálata primer malignus melanomákban

7-es kromoszóma és az EGFR gén FISH-el kimutatott számbeli eltérései

Kísérleteink másik szakaszában célunk volt a korábbi vizsgálataink során CGH-val kimutatott 7p12 többlet sejtszintű eltéréseinek vizsgálata, a 7p12-es lokuszon lokalizálódó EGFR génamplifikáció mértékének karakterizálása primer melanomákban, valamint a génamplifikáció és daganatprogresszió közötti kapcsolat elemzése. Tanulmányoztuk az EGFR gén, valamint a 7-es kromoszóma számbeli eltéréseit, azok kapcsolatát a sporadikus melanomák klinikai és hisztopatológiai paramétereivel. Kísérleteinkhez friss és fagyasztott tumorokból készített lenyomat preparátumokat használtunk. A minták a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájáról származtak, szövettani diagnózist követően. Nyolcvanegy primer melanoma minta interfázisos FISH analízisét végeztük el (44 férfi és 37 nő), 61 tumornál a követési idő több mint 5 év volt. A tumorok klinikopatológia tulajdonságait az 1-es táblázatban foglaltuk össze. FISH kísérleteinkben fluoreszcens dUTP-vel módosított 7-es centroméra- és EGFR génspecifikus DNS próbákat párhuzamosan hibridizáltuk. Az EGFR gén eltéréseit az Anyagok és Módszerek részben ismertetett kategóriákba csoportosítottuk. A tumorok ploiditásának meghatározásához a 7-es kromoszómán kívül 1-es, 3-as, 6-os, 8-as, 9-es, és 10-es kromoszómák számbeli eltérését is vizsgáltuk centroméra specifikus próbák alkalmazásával. Minden tumornál legalább három különböző kromoszómánál detektáltunk számbeli eltérést, mely magába foglalta a 9-es és 10-es kromoszómák delécióját, valamint a 6-os és 8-as poliszómiáját. A 7-es kromoszóma aneuszómiáját a léziók 70%-ában mutattuk ki (15. táblázat).

15. Táblázat

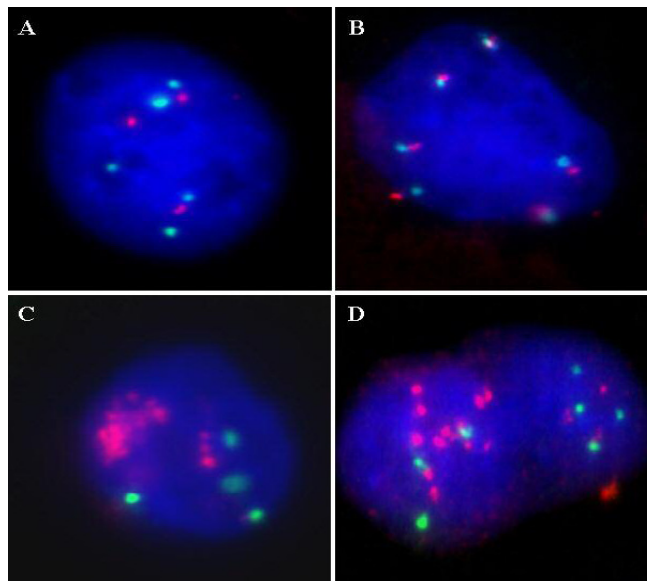
7-es kromoszóma és az EGFR gén számbeli eltéréseinek kapcsolata

		EGFR gén kópiaszám eltérései				
		Amplifikációs státusz				
7-es kromoszóma	n ^a (%)	Normál n (%)	Deléció n (%)	Látszólagos n (%)	Kismértékű n (%)	Nagymértékű N (%)
Monoszómia	3 (3,7)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Diszómia	24 (29,6)	17 (71)	1 (6)	0 (0)	6 (33)	0 (0)
Poliszómia	54 (66,7)	0 (0)	3 (6)	12 (22)	33 (61)	6 (11)

^a kategóriákba tartozó primer melanomák száma

Az EGFR gén számbeli eltérését 64 (79%) lézióban figyeltük meg. Az EGFR gén index 1,0 és 8,9 között változott. A primer melanomák többségére a gén kismértékű amplifikációja volt jellemző. Tizenhárom melanomában detektáltunk nagymértékű amplifikációt, de ez az elváltozás csak hat tumornál érintette a sejtek több mint 10%-át (15. táblázat). Az EGFR többlete a 7-es kromoszóma poliszómiájával társult ($p < 0,0001$). A gén amplifikációja mellett három mintában a gén delécióját is kimutattuk, mely a 7-es kromoszóma monoszómiájával asszociálódott.

Az EGFR gén FISH-el kimutatott jellegzetes kópiaszám eltéréseit a 10-es ábrán foglaltuk össze.



10. Ábra

Primer melanoma sejtek interfázisos FISH analízise EGFR gén (piros szignál) és 7-es kromoszóma specifikus (zöld szignál) próbával, a sejtmagok DAPI-val jelöltek (kék)
A.) EGFR deléció, B.) látszólagos amplifikáció, c.) klaszteres amplifikáció, d.) „scattered” gén amplifikáció

EGFR mRNS expresszió, EGFR fehérje expresszió és EGFR gén kópiaszám eltérés kapcsolata

Tizenhat FISH-el analizált melanoma mintánál az EGFR génkópiaszám eltéréseket génextpressziós adatokkal is össze tudtuk hasonlítani. Az EGFR mRNS mennyiségi meghatározásához az Affymetrix array-en lévő 201984_s_at próba \log_2 transzformált expressziós értékeit használtuk. Az array-en kapott génextpressziós eredményeket qPCR-al erősítettük meg. Az expresszió és a génkópiaszám eltéréseire vonatkozó adatokat a 16. táblázatban foglaltuk össze.

Hét lézióban nem találtunk EGFR kópiaszám eltérést, ezen minták expressziós értékeinek átlagát választottuk viszonyítási értéknek (0,61; tartomány: 0,51 – 0,73). A további minták közül 5-öt kismértékű amplifikáció, 3-at látszólagos amplifikáció, és 1-et nagymértékű amplifikáció jellemzett. Ezen mintákból öt lézióban több mint kétszeres mRNS szintet mutattunk ki a 7 nem amplifikált mintához viszonyítva. Az egyik látszólagos amplifikációt hordozó mintában (7-es minta) több mint ötszörös mRNS szintet figyeltünk meg, ugyanakkor a léziót a receptor fehérje gyenge kifejeződése jellemezte. A 9-es mintában kismértékű amplifikációt és közepes fehérje expressziót detektáltunk.

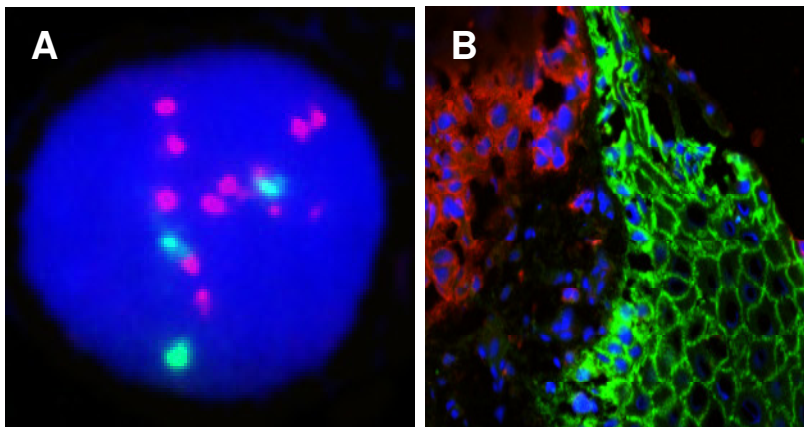
16. Táblázat
EGFR gén kópiaszám eltérés, mRNS- és fehérje expresszió kapcsolata

Melanoma minták	mRNS ^a	Immunhisztokémiai kategóriák	EGFR amplifikációs státusz	EGFR kópiaszám eltérést mutató sejtek %-a	Átlagos gén kópiaszám
1	1,17	0	nagymértékű	95	8,0
2	4,83	+	kismértékű	98	5,9
3	3,44	+	kismértékű	92	4,9
4	3,12	0	kismértékű	92	5,4
5	1,58	++	kismértékű	97	7,4
6	0,51	0	kismértékű	50	2,6
7	5,05	+	látszólagos	64	3,3
8	3,60	++	látszólagos	24	2,4
9	0,77	++	látszólagos	31	2,4

^a EGFR specifikus Affymetrix 201984_s_at próba expressziós szintjének változása („fold-change” értékek) melanoma mintákban a 7 EGFR eltérést nem hordozó lézió átlag expressziós értékéhez viszonyítva (0,61).

Az immunhisztológiai vizsgálatokra a FISH eredmények alapján látszólagos-, kismértékű és nagymértékű amplifikációt hordozó, valamint normál kópiaszámú és EGFR delécióval jellemezhető mintákat választottunk ki. Az EGFR fehérje kimutatására a fehérje extracelluláris részére specifikus direkt jelzett antitestet alkalmaztunk. Annak érdekében, hogy a mintákban a melanoma sejteket elkülönítsük a bőrben található egyéb sejtektől CD63 melanoma antigénre specifikus monoklonális antitestet használtunk. A kontroll mintaként használt normál bőrben az epidermisz réteg keratinocitáinak erőteljes EGFR expresszióját, ugyanakkor a CD63 festődés teljes hiányát figyeltük meg. Ezzel szemben a tumor mintákban a melanoma sejteket erőteljes membrán és citoplazmatikus CD63 kötődés jellemezte. A léziókban az EGFR fehérje gyenge vagy expressziójának teljes hiánya volt megfigyelhető függetlenül a mintákban detektált EGFR kópiaszámától és az mRNS expressziójának

mértékétől. Kismértékű amplifikációt hordozó melanomákban gyenge illetve közepes mértékű fehérje expressziót figyeltünk meg. A számbeli eltérést nem tartalmazó melanomákban EGFR fehérjét nem tudtunk kimutatni. Nagymértékű amplifikáció nem társult fehérje expresszióval (11-es ábra).



11. Ábra

EGFR amplifikáció és CD63 és EGFR expresszió ugyanabból a betegből származó interfázisos sejten (A) és szöveti metszeten(B)

A.) Az EGFR gén nagymértékű amplifikációja; EGFR gén (piros fluoreszcencia), 7-es kromoszóma (zöld fluoreszcencia), sejtmag DAPI-val jelölt (kék fluoreszcencia) B.) az epidermisz sejtekben erőteljes EGFR expresszió látható (zöld), a melanoma sejteket CD63 pozitívítás (piros) és az EGFR fehérje kifejeződésének hiánya jellemezte.

Tekintettel arra, hogy számos szolid daganatban gyakori eltérés az EGFR gén amplifikációja mellett a gén 19-es exonjának mutációja, mely a receptor fehérje intracelluláris tirozinkináz egységének folyamatos aktivációjához vezet függetlenül az extracelluláris rész ligand általi stimulációjától, huszonhét melanoma mintánál megvizsgáltuk a 19-es exon mutációjának jelenlétét is olvadáspont analízissel. A mutáció jelenlétét az adott szakaszon egyetlen melanoma mintánál sem tudtunk kimutatni.

Klinikopatológiai paraméterek és az EGFR gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat vizsgálata

Betegek kora és neme: A melanomás betegek többsége az 50 évnél idősebb korosztályhoz tartozott. Ezekből a betegekből eltávolított daganatokban gyakrabban mutattunk ki EGFR gén többletet, de ez az eltérés nem volt szignifikáns az 50 évnél fiatalabb betegekből származó melanomákhoz képest. A férfiak és nők melanoma mintái között az EGFR átlagos kópiaszáma közel azonosnak adódott, bár kismértékű amplifikációt és deléciót nagyobb

százalékban detektáltunk a férfi betegekből eltávolított melanomákban ($p = 0,05$, 17-18. táblázat).

Hisztológiai altípus: Az EGFR gén számbeli eltérései közel azonos mértékben fordultak elő az SSM és NM tumorokban. A gén nagymértékű amplifikációját 5 noduláris tumornál mutattuk ki, ugyanakkor ezt az elváltozást csak egy SSM léziónál figyeltük meg. Az átlagos génkópiaszám szignifikánsan magasabb volt a rosszabb prognózisú NM melanomáknál (17. táblázat, $p = 0,023$).

17. Táblázat
A sejtenkénti átlagos EGFR kópiaszám és a melanomák klinikopatológia tulajdonságai közötti kapcsolat

Klinikai paraméterek	Analizált tumorok	EGFR gén index	\pm SD ^a	P érték ^d
NM ^b	39	3,85	1,92	0,023
SSM ^c	42	3,01	1,29	
Férfi	43	3,54	1,76	0,458
Nő	38	3,27	1,57	
Fiatalabb 50 évnél	23	2,97	1,26	0,170
50 éves vagy idősebb	58	3,42	1,57	
Breslow vastagság < 4 mm	37	2,74	0,87	<0,0001
Breslow vastagság \geq 4 mm	44	3,98	1,95	
Nem ulcerált	40	2,82	1,01	<0,0001
Ulcerált	41	3,98	1,97	
Nem metasztatizál	20	2,79	0,93	0,038
Metasztázis képzés	41	3,50	1,64	
Több mint 5 éves túlélés	28	2,99	1,69	0,151
Exitus 5 éven belül	33	3,51	1,46	

^aSD, szórási; ^bNM, noduláris melanoma; ^cSSM, superficial spreading melanoma

^dMann-Whitney-Wilcoxon teszt

Daganat vastagság: A daganat vastagság és az EGFR alteráció közötti összefüggést vizsgálva, az átlagos EGFR kópia szignifikánsan magasabb értékűnek adódott a 4,01 mm-nél vastagabb tumorokban a vékonyabb tumorokhoz képest ($p < 0,0001$, 17.táblázat). A gén látszólagos és kismértékű amplifikációját az összes vastagsági kategóriába tartozó daganatnál kimutattuk, de az EGFR nagymértékű amplifikációja csak a >4,01 mm-nél vastagabb melanomákra volt jellemző ($p = 0,05$, 18. táblázat).

Metasztázis képzés és túlélés: Az EGFR kópiaszám index az 5 éven belül metasztatizist képző daganatokban szignifikánsan magasabbnak adódott a nem metasztatizáló tumorokéhoz képest (17. táblázat, $p=0,038$). Nagymértékű amplifikációt csak az áttétet képző melanomákban mutattunk ki. Ugyanakkor a gén többlet mellett 4 metasztatizáló lézióban az EGFR gén 7-es kromoszómához viszonyított vesztesét is megfigyeltük. A kifekélyesedő felszínű daganatokban szintén szignifikánsan magasabb EGFR génindex volt jellemző ($p < 0,0001$). Az EGFR extrakópia rövidebb túléléssel is társult. Összességében, adataink alapján elmondhatjuk, hogy az EGFR gén többlete, a magasabb EGFR génindex primer

melanomákban rossz prognózissal társul.

18. Táblázat

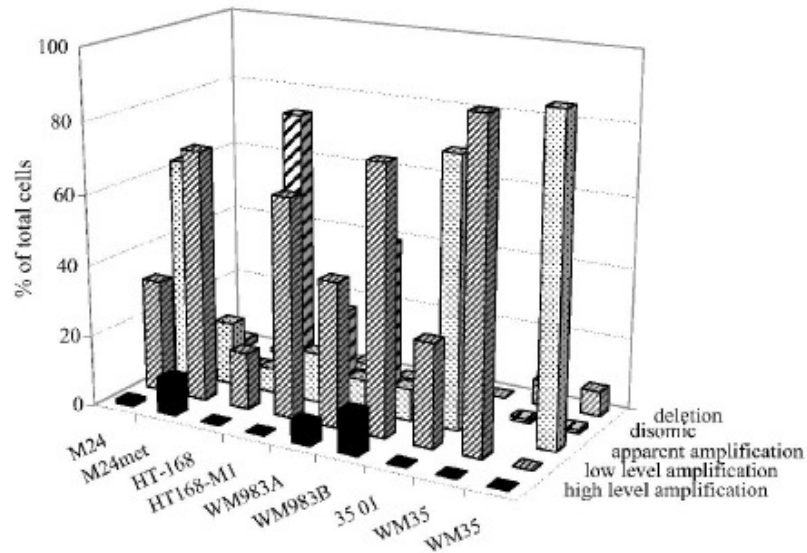
EGFR kópiaszám eltérés és a malignus melanoma klinikai paramétereinek közötti összefüggés

	Mintaszám (db)	Normál n (%)	Deléció n (%)	Látszólagos n (%)	Kis- mértékű n (%)	Nagy- mértékű n (%)	P
Tumor típus							0,4
NM	39	7 (18)	4 (10)	4 (10)	19 (49)	5 (13)	
SSM	42	10 (24)	3 (7)	8 (19)	20 (48)	1 (2)	
Nem							0,05
Férfi	44	5 (11)	6 (14)	5 (11)	25 (57)	3 (7)	
Nő	37	12 (32)	1 (3)	7 (19)	14 (38)	3 (8)	
Életkor (évek)							0,1
20-50	22	5 (23)	4 (18)	1 (4)	9 (41)	3 (14)	
>51	59	12 (20)	3 (5)	11 (19)	30 (51)	3 (5)	
Clark invázió							0,4
I, II, III	27	9 (33)	1 (4)	3 (11)	12 (45)	2 (7)	
IV, V	54	8 (15)	6 (11)	9 (17)	27 (50)	4 (7)	
Vastagság (mm)							0,05
<2,00	21	8 (38)	2 (10)	3 (14)	8 (38)	0 (0)	
2,01-4,00	16	5 (31)	1 (6)	4 (25)	6 (38)	0 (0)	
>4,01	44	4 (9)	4 (9)	5 (11)	25 (57)	6 (14)	
Lokalizáció							0,1
Törzs	42	6 (14)	6 (14)	7 (17)	21 (50)	2 (5)	
Végtagok	27	8 (30)	1 (4)	5 (18)	12 (44)	1 (4)	
Fej	10	3 (30)	0 (0)	0 (0)	4 (40)	3 (30)	
Ulceráció							0,004
Nincs	40	14 (35)	3 (8)	7 (17)	16 (40)	0 (0)	
Van	41	3 (7)	4 (10)	5 (12)	23 (56)	6 (15)	
Metasztázis képzés							0,04
Nem metastatizál	21	8 (38)	1 (5)	2 (9)	10 (48)	0 (0)	
Metasztatikus	40	3 (7)	4 (10)	7 (18)	22 (55)	4 (10)	

7-es kromoszóma és az EGFR gén kópiaszám eltérése, az EGF receptor sejtfelszíni részének expressziója és intracelluláris foszforilált formájának szintje melanoma sejtvonalakban

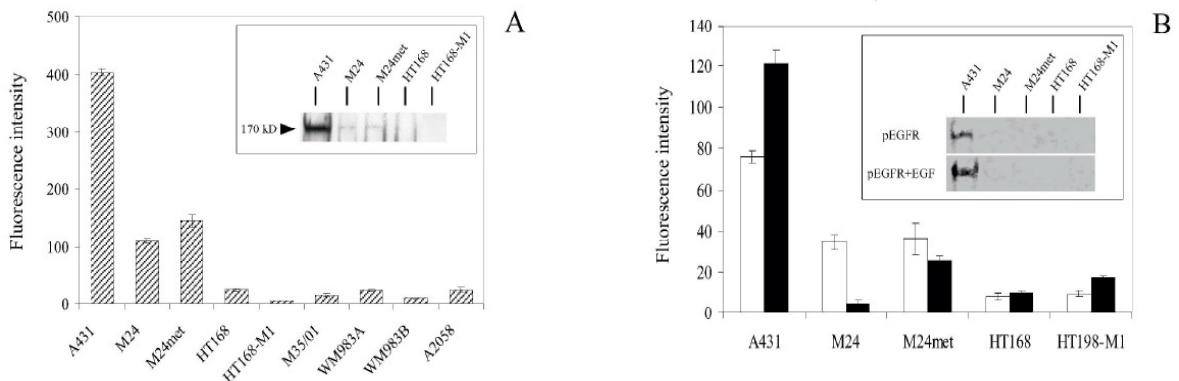
A sporadikus melanoma minták FISH analízise mellett nyolc különböző metastatikus tulajdonságú melanoma sejtvonalat elemeztünk EGFR és 7-es centroméra specifikus próbával. Az *in vitro* rendszer vizsgálata lehetőséget ad a gének kópiaszám és a fehérje kifejeződés mértékének meghatározásán túl, a receptor aktivációs állapotának megállapítására is. Mind a nyolc melanoma sejtvonalra jellemző volt a 7-es és az EGFR eltérések mintán belüli heterogenitása (12. ábra). A WM983A és HT168 sejtvonalakban az EGFR amplifikációt hordozó sejtek kis százaléka mellett nagyszámú diszómias sejtet figyeltünk meg. Kismértékű amplifikációt az összes sejtvonalban kimutattunk. Nagymértékű amplifikációt csak a M24met, WM983A és WM983B sejtvonalaknál detektáltunk, de ezen alterációt hordozó sejtek százalékos aránya nem haladta meg a 15 %-ot egyik mintánál sem. Az EGF receptor fehérje extracelluláris részének mennyiségét áramlási citometriával és

Western blot analízissel egyaránt vizsgáltuk. A kontroll A431-es epidermoid karcinóma sejtvonalat az EGF receptor fehérje magas expressziója jellemezte, ugyanakkor a melanoma sejtvonalakban a fehérje extracelluláris részének kifejeződését nem mutattuk ki. Egyedül az M24 és annak metasztázis párjában (M24met) detektáltuk a receptor fehérje gyenge expresszióját (13A. ábra).



12. Ábra Melanoma sejtvonalakban az EGFR gén és 7-es kromoszóma számbeli eltérései

Az EGFR foszforilált tirozinkináz részének (pEGFR) mennyiségét EGF liganddal történő stimuláció előtt és után egyaránt tanulmányoztuk.



13. Ábra melanoma sejtvonalakon az EGFR fehérje expresszió meghatározása áramlási citometriával és western blot technikával. A. a receptor extracelluláris expressziójának mértéke. B. a foszforilált EGFR mennyisége a receptor liganddal történő aktiváció előtt és után.

Az analizált sejtvonalak közül, függetlenül a 7-es kromoszóma és az EGFR gén kópiaszámától, egyedül csak az M24 sejtvonalban tudtuk kimutatni az EGFR intracelluláris tirozinkináz részének foszforilációját, melynek mennyisége ligand kezelés hatására nem változott (13B. ábra).

Ezzel ellentétben a nagymértékű EGFR amplifikációt hordozó A431 kontrol sejtvonalban kétszer magasabb volt a pEGFR-el szintje stimuláció előtt az M24 sejtvonalhoz képest, ez a mennyiség ligandkezelés hatására szignifikáns mértékben megnövekedett (13B. ábra).

9p21 lokusz és a 9-es kromoszóma kópiaszám eltérései primer malignus melanomában

Kísérleteink célja a 9p21 régió kópiaszám eltéréseinek analízise interfázisos melanoma sejtekben fluoreszcencia *in situ* hibridizációval, valamint az eltérések és a daganatok klinikopatológiai tulajdonságai közötti kapcsolat vizsgálata. Nyolcvanegy primer melanomát analizáltunk 9p21 lokusz és 9-es centroméra specifikus próbákkal. A daganatokat klinikai és patológiai tulajdonságaik alapján csoportokra osztottuk (3. táblázat). A 9p21-es lokusz és 9-es centroméra specifikus szignálokat valamennyi sejtben együttesen értékeltük. Monoszómiásnak tekintettük azt a daganatot, amelyben a vizsgált sejtek több mint 20%-a egy jelet, poliszómiásnak, amelyben a vizsgált sejtek több mint 15%-a két 9-es centroméra szignált hordozott.

A 9-es kromoszóma delécióját a korai és a késői stádiumú melanomákban egyaránt nagy százalékban kimutattuk. A 9-es kromoszóma vesztését a felszínesen terjedő (SSM) minták 44%-ában, míg a noduláris altípusba (NM) tartozó tumorok 24%-ában detektáltuk. A kromoszóma poliszómiáját 25 lézióban az analizált sejtek több mint 20%-ában figyeltük meg, ez az elváltozás 16 tumor esetében a sejtek több mint 50%-át érintette. Ezekben a tumorokban a poliszómiás sejtek mellett monoszómiás sejtpopuláció nem volt kimutatható. Egy lézióban több mint hat 9-es centroméra szignált találtunk a sejtek jelentős részében. A 9-es kromoszóma poliszómiája mindkét hisztológiai altípusban hasonló frekvenciával fordult elő (31%).

A 9p21 lokusz delécióját 67 melanomában (83%) mutattuk ki, mely 22 esetben a 9-es kromoszóma vesztésével társult (27%). Mindössze 7 minta hordozta a sejtek több mint 60%-ában a lokusz homozigóta delécióját. A régió legjellemzőbb eltérése a 9-es kromoszómához viszonyított relatív vesztése volt, melyet a minták 57%-ban detektáltunk. Tizennégy melanomában a 9p21 homozigóta delécióval jellemezhető sejtcsoportok mellett heterozigóta

deléció hordozó sejtpopulációk jelenlétét is megfigyeltük (19. táblázat).

19. Táblázat
Primer melanomák 9p21-es FISH adatainak összefoglalása

	n (%)
homozigóta deléció ^a	7 (8,6)
homozigóta deléció és 9p21 <CEP 9 ^b	14 (17,3)
9p21 <CEP 9	46 (56,8)
9p21 = CEP 9 ^c	5 (6,2)
9p21 > CEP 9 ^d	1 (1,2)
nincs 9p21 eltérés	7 (8,6)

^anincs 9p21 szignál

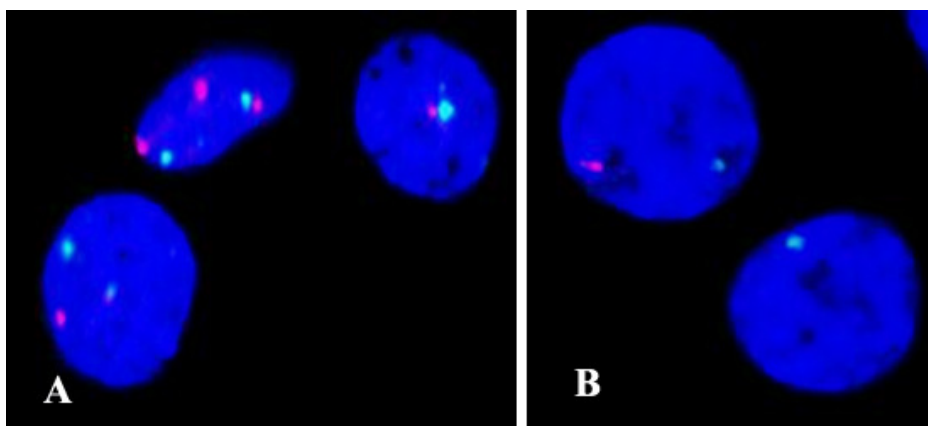
^bhomozigóta és a 9-es centromérához viszonyított relatív 9p21 vesztést hordozó sejtpopulációk jelenléte

^cszignál/sejt >2 mindkét próbánál

^d9p21 lokusz 9-es centromérához viszonyított relatív többletét hordozó domináns sejtpopuláció

Domináns homozigóta delécióval (a sejtek 63-86 %) és 9p21 többlettel rendelkező sejteket 5 tumornál figyeltünk meg. Kilenc melanománál a sejtek 40-76% százalékában 9p21-es extra kópiát detektáltunk ugyanakkor a sejtek kis hányadában a lokusz homozigóta delécióját is megfigyeltük. Hét lézióban nem tudtunk kimutatni 9p21-es lokuszt érintő eltérést FISH-el.

A 14. ábra szemlélteti a primer melanomákban FISH-el kimutatott jellegzetes 9p21-es eltéréseket. Az 14.A ábrán 3 különböző 9p21 számbeli eltérést hordozó sejt látható.



14. Ábra FISH fluoreszcens mikroszkóp felvételen 9p21 kópiaszám többlet és heterozigóta és homozigóta delécióval rendelkező melanoma sejtek láthatóak. A 9-es centroméra zöld a 9p21 lokusz specifikus szignál piros színnel látszik.

Az egyik sejtben két 9-es kromoszóma szignált és egy 9p21 szignál látható ami heterozigóta deléciót jelent, a másik sejt egy 9p21 lokusz és egy 9-es kromoszóma specifikus jelet tartalmaz. A harmadik sejt a 9p21-es lokusz extra kópiaszáma jellemző. Az 14.B ábrán a 9p21 régió teljes hiányát, homozigóta delécióját szemlélteti.

A melanoma minták klinikai paraméterei és a 9p21-es eltérések közötti összefüggést a 20. táblázatban foglaltuk össze. A 9-es kromoszóma aneuszómiajának mértéke szignifikánsan

eltért a hisztológiai altípusok között. Ezzel szemben, a 9p21-es lokusz alterációnál nem találtunk szignifikáns különbséget a két altípus között.

20. Táblázat
*Primer melanomák klinikopatológiai tulajdonságával összefüggő
 9p21-es kópiaszám változások*

Melanoma minták	n	9p21 eltérések			
		Homozigóta deléció (%)	9p21<CEP 9 (%)	9p21 < CEP 9 és homozigóta deléció (%)	9p21 többlet (%)
Tumor típus ^a					
NM	42	6 (14,3)	25 (59,5)	6 (14,3)	3 (7,1)
SSM	39	1 (2,5)	21 (53,4)	9 (23,0)	3 (7,6)
Nem					
Férfi	47	4 (8,5)	28 (59,6)	10 (21,2)	2 (4,2)
Nő	34	3 (8,8)	18 (52,9)	5 (14,7)	4 (11,7)
Életkor (év)					
20-50	25	1 (4,0)	15 (60,0)	6 (24,0)	1 (4,0)
>50	56	6 (10,7)	31 (55,4)	8 (14,3)	5 (8,9)
Breslow vastagság (mm) ^b					
<2,00	17	0 (0)	12 (70,6)	3 (17,6)	1 (0,1)
2,01-4,00	14	3 (21,4)	7 (50,0)	4 (28,5)	0 (0)
>4,01	50	4 (8,0)	27 (54,0)	8 (12)	5(5,8)
Clark szint					
I, II, III	30	2 (6,7)	16 (53,3)	6 (20,0)	1 (3,3)
IV, V	51	5 (9,8)	30 (58,8)	9 (17,6)	5 (9,8)
Ulceráció					
Nincs	35	2 (5,7)	20 (57,1)	6 (17,1)	1 (6)
Van	46	5 (10,9)	26 (56,5)	9 (19,6)	5 (13)
Lokalizáció					
Törzs	45	3 (6,7)	23 (51,1)	10 (22,2)	3 (6,7)
Végtagok	28	4 (14,3)	12 (42,3)	4 (14,3)	2 (7,1)
Fej	8	0 (0)	6 (75,0)	0 (0)	1 (12,5)
Metasztázis képzés ^c					
Nem metastatizál	38	3 (7,8)	20 (52,6)	6 (15,8)	3 (7,9)
Metasztázis képző	43	4 (9,3)	26 (60,0)	9 (20,9)	3 (7,0)

^aNM: noduláris melanoma, SSM: superficial spreading melanoma

^bBreslow vastagsági kategóriák

^cMetasztázis kialakulás a primer tumor eltávolítása után két éven belül.

Bár a noduláris melanomákba a lokusz homozigóta delécióját gyakrabban figyeltük meg, a régió többlete közel azonos gyakorisággal fordult elő mindkét altípusban. Érdekes jelenség, hogy a 2 mm-nél vékonyabb daganatokban nem detektáltuk a lokusz homozigóta delécióját. A 9p21 régió hiánya az összes késői stádiumú melanomára jellemző volt. Adatainkat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a 9p21-es lokusz számbeli eltérései nem mutatnak szoros összefüggést a tumorok klinikopatológiai paramétereivel (Fisher teszt).

A 9p21-es régió számbeli rendellenességei mellett, kíváncsiak voltunk arra is, hogy a lokusz kópiaszám eltérései milyen hatást gyakorolnak az itt lokalizálódó CDKN2A tumorsuppresszor gén expressziójára. Tizennyolc melanoma FISH-el és génexpressziós

adatait tudunk összehasonlítani (21.táblázat)

21. Táblázat
CDKN2A mRNS expresszió és a 9p21 alterációk kapcsolata

Minta szám	Génexpressziós változás ^a	Homozigóta deléció ^b (%)	9p21 vesztes ^c (%)	9p21 extra kópia ^d (%)
1	-51,12	0,0	7,9	79,2
2	2,22	0,0	0,0	71,4
3	6,76	0,0	20,9	67,8
4	3,47	1,8	20,2	66,1
5	-20,42	1,7	63,0	14,3
6	1,45	0,0	0,0	12,1
7	-2,10	0,0	4,3	10,9
8	-1,02	1,9	41,9	10,5
9	1,26	0,0	52,3	7,2
10	-1,18	2,7	7,3	6,4
11	6,65	0,0	0,8	5,8
12	-1,85	0,0	0,6	5,6
13	1,08	0,0	92,0	5,3
14	1,21	0,0	43,1	1,8
15	1,04	0,0	93,1	1,4
16	-1,25	0,0	69,2	1,2
17	-3,24	90,6	1,9	0,6
18	-58,28	70,6	11,8	0,0

^aNaevus p16 mRNS szintjéhez viszonyított génexpressziós változás

^bA 9-es és a 9p21-es szignál hiánya

^cA 9p21 régió 9-es kromoszómához viszonyított relatív vesztesése

^d9p21=9-es centroméra>2 a sejtek több mint 15%-ában

A kísérletekhez kvantitatív valós idejű PCR technikát alkalmaztunk, kontrollként naevus mintát használtunk. Négy mintában a CDKN2A gén kontrollhoz viszonyított több mint kétszeres expressziós szintjét mutattuk ki. Ezek közül három lézióban a sejtek több mint 65%-a hordozott 9p21 többletet. Kilenc melanománál a CDKN2A expressziójának csökkenését figyeltük meg, két tumorban a sejtek 71% valamint 91%-a 9p21 homozigóta deléciót hordozott. További három tumorban a sejtek 40-70%-ában a lokusz teljes hiányát figyeltük meg.

Megbeszélés

A melanoma emelkedő incidenciája és az előrehaladott betegség hatásos kezelésének hiánya világszerte fokozódó egészségügyi problémát jelent⁵⁸. A melanoma a növekedő incidenciája mellett egyre fiatalabb korosztályot érint. A daganat korai stádiumban történő detektálása és az időben elvégzett korrekt sebészeti kezelése jelenleg az egyetlen esély a beteg tartós gyógyulására. Az első áttétek kialakulásával a beteg túlélési esélyei drámaian csökkennek és az első távoli metasztázis megjelenésével az ötéves túlélés 10 % alá zuhan⁵⁹.

Hasonlóan számos szolid tumorhoz, a melanoma is olyan genetikai betegség, melynek kialakulása és progressziója során a genetikai eltérések sorozatos akkumulációja révén sérülnek a genom integritását szabályozó molekuláris mechanizmusok, melyek onkogének aktiválódását és onkoszuppresszor gének inaktiválódását eredményezik⁶⁰. A gyakori mutációt vagy kromoszómális alterációt mutató géneknek, az intenzív kutatások ellenére még csak kis hányadát ismerjük. Kutatásaink során kiemelten fókuszálunk azoknak az alterációknak az azonosítására, melyek a különböző biológiai viselkedésű melanomákra karakterisztikusak, továbbá célunk olyan eltérések keresése, melyek diagnosztikus értékűvé válhatnak és jelentőségük lehet a betegség kimenetelének megjósolásában, vagy akár terápiás targetként szolgálhatnak.

Malignus melanomák génexpressziós mintázatának meghatározása microarray technikával

A microarray-ek több ezer gén expressziójának genomi alterációjának kimutatására alkalmasak, a technika áttörést jelent a betegségek háttérben álló molekuláris történések megismerésében. A módszerekkel feltárt ismeretek hozzájárulnak a különböző klinikai lefolyást mutató, de ma még azonos csoportba sorolt betegségek molekuláris osztályozásához, ami segít a pontosabb prognózis megjósolásában és a hatékonyabb, a betegre szabott célzott terápia kiválasztásában. Ma már számos lehetőséget rejt magában a microarray technológia, többek között módot ad pl. a génexpresszió, génamplifikáció, géndeléción, fehérjeexpresszió, metilációs mintázat stb. tanulmányozására. A normál és daganat szövetben lévő eltérések összehasonlítása fontos információ forrása, hiszen a malignus daganatok viselkedését, a daganatsejtek terápiára történő válaszát sok esetben a hibás gének működése határozza meg. Így jogos az a feltételezés, hogy a normálistól eltérő génexpresszió mintázat a jelenlegi, a daganatok viselkedését jellemző paraméterek közül sokkal pontosabb információt

hordoznak⁶¹. A génextpressziós mintázat alapján lehetővé válik a melanomák biológiailag eltérő csoportokba történő osztályozása, ez a klasszifikáció hozzájárulhat a jelenlegi klinikopatológiai paraméterek alapján nem értelmezhető daganatok klinikai viselkedésének megértéséhez. Annak ellenére, hogy a daganatok diagnosztikai klasszifikációja sok esetben eléggé előrehaladott, a molekuláris mechanizmusok, melyek a génextpressziós változások hátterében állnak sok szempontból nehezen megfoghatók és a génextpressziós mintázat alapján történő specifikus terápia targetek azonosítása ezért még korlátozott.

Kísérleteink során 37 primer és 6 metasztatizáló melanoma génextpressziós eltéréseit vizsgáltuk microarray technikával. Tekintettel arra, hogy a melanoma génextpressziós vizsgálatait megnehezíti a releváns, egységes kontrol minta hiánya, ezért a melanomák klinikopatológiai paramétereit alapján képzett csoportok génextpressziós mintázatát hasonlítottuk össze.

Primer melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő génextpressziós eltéréseket vizsgálva, szignifikáns mértékű expressziós változást egyedül a daganatok felszínének kifeléelyesedésével (ulceráció) és a melanomák metasztatizálóképző tulajdonságával összefüggésben mutattunk ki. Irodalmi adatok szerint a Breslow vastagság és bizonyos gének expressziója között kapcsolat áll fent^{35, 62}. A különböző analízisek eredménye viszont nehezen hasonlítható össze, aminek oka, hogy az egyes tanulmányokban eltérő vastagsági kategóriákat alkalmaztak, melyek nem azonosak a TNM klasszifikáció hivatalosan használt Breslow kategóriákkal. Az expressziós eredmények heterogenitását jelzi, hogy a 2000-ben elsőnek közölt, melanoma biopsziákon elvégzett microarray tanulmányban egyik klinikai paraméterhez sem tudtak társítani szignifikáns mértékű expressziós változást⁶³.

Ulcerációval kapcsolatos mRNS szint változást 1095 génnél mutattunk ki. A gének többsége az ulcerált felszínű melanomákban csökkent expresszióval, míg ugyanezen gének megnövekedett expressziós szintjét figyeltük meg a nem kifeléelyesedő felszínű melanoma mintákban. A rosszabb prognózisú léziókban a legmagasabb expressziós intenzitási átlagértékkel (11.82) a 4q21-q25 kromoszómális szakaszon lokalizálódó osteopontin (OPN) génre mutattunk ki. Az osteopontin egy glükofoszfoprotein, mely az integrin útvonalon keresztül befolyásolja a tumorsejtek és az extracelluláris mátrix fehérjéi közötti kapcsolatot, ezáltal hatást gyakorolva a sejt migrációra és a metasztatizálásra. Zhou és mtsai. melanoma sejtvonalakon megfigyelték, hogy az osteopontin expresszió növekedés a sejtek migrációs és invazív képességének fokozódásával társul³³. Smith és mtsai. a melanoma progresszió egyes lépéseit reprezentáló: normál bőr, naevus, atípusos naevus, korai és késő fázisú melanoma mintákat elemezve a késői stádiumú melanomákban szintén kimutatták az osteopontin magas expressziós szintjét, mely több mint 50-szerese volt a progresszió korai

szakaszában lévő melanomákhoz viszonyítva⁶⁴. Az OPN az Nf- κ B transzkripciós faktort indukálja, a gátló (I κ B- α) molekulájának foszforilálásával, mely az inhibitor degradációjához vezet⁶⁵. Ez a jelenség magyarázatot adhat a késői stádiumú melanomákban kimutatott emelkedett Nf- κ B szintre⁶⁶. Az Nf- κ B által regulált gének között szerepel számos kemokin ligand és receptor, melyek a faktor folyamatos aktivációja miatt konstitutívan expresszálódnak. Kísérleteinkben a kemokin család tagjai közül megemelkedett expressziós szintet: CXCL8, CXCL11, CXCL14, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCR4 génekneként figyeltünk meg. Az array adatok hitelesítéséhez használt qPCR kísérletekben a két különböző prognózisú csoport között a legnagyobb változást a CXCL8 vagy másnéven IL8 mutatta (119-szeres változás).

Hasonlóan hozzánk, irodalmi adatok a CXCL8, CXCL1, CCL5 és CCL2 génekre vonatkozóan számolnak be magas expressziós szintről⁶⁷⁻⁷⁰. Schaidler és munkatársai az IL8 megnövekedett mennyiségét teszik felelőssé a metasztatikus tumorsejt klónok kialakulásáért, továbbá az RGP-VGP átmenetért⁷¹. Az IL8 multifunkcionális, szerepet játszik, a tumorsejtek migrációjában és az angiogenezis mediálásában⁷². Ezt a megfigyelést alátámasztani látszik, hogy a CXCL8 elleni antitest alkalmazásával gátolni lehet az angiogenezis folyamatát⁷³.

A jobb prognózisú daganatokban legnagyobb mértékben a defenzin béta szintje emelkedett meg. Érdekes, hogy a gén promóter régiója szintén az Nf- κ B transzkripciós faktor specifikus kötőhelyét tartalmazza⁷⁴. Az irodalmi adatokkal megegyezően a génexpressziós vizsgálataink során kimutatott változások az Nf- κ B transzkripciós faktor szerepére utalnak.

Primer melanoma microarray vizsgálatából származó melanoma progresszióhoz kapcsolható génexpressziós változásról az utóbbi 2 évben három jelentősebb tanulmány született. Winnepenninckx és munkacsoportja 58 primer melanomát elemzett, eredményeik alapján 254 gén expressziós változását társították rossz prognózishoz, rövidebb túlélési időhöz³⁵. Mandruzzato és munkacsoportja 43 primer lézió microarray analízisét végezte el, 70 génre mutattak ki a progresszióhoz kapcsolható eltéréseket⁷⁵. A 2007-es év elején publikálta Jaeger és mtsai 19 primer és 20 metasztázison elvégzett microarray eredményeit, ők 308 gén expressziós változását társították a melanoma metasztatizáló képességéhez⁶². A három munkacsoport által azonosított gének között egyetlen egy elváltozás sem közös.

Mindhárom tanulmány génlistájával összehasonlítottuk az elemzéseink során azonosított ulcerációval összefüggő expressziós változást mutató 1095 gént.

Winnepenninckx által közölt génlistából 8 közös gént találtunk saját adatainkkal.

22. Táblázat Az irodalmi adatokkal közös melanoma progresszióval összefüggő expressziós változást mutató gének funkcionális csoportosítása (IPA)

Molekulák funkció szerinti csoportosítása	Fő funkciók (IPA)	Jelátviteli útvonalak (KEGG)
ANK3, CLCA2, DSC1, DSG1, DSG3, DSP, DST, EVPL, FGFR2, FGFR3, FLG, IRF6, ITGB4, IVL, JUP, KLK7, KRT5, KRT10, MAPK13, NTRK2, PKP1, POU2F3, PPL, S100A7, SDC1, SERPINB5, SFN, SULF1, TP73L	Bőr- és szőrfejlődési funkció, dermatológiai betegségek	Olfaktórikus transzdukció: CLCA2 Sejt kommunikáció: DSC1, DSG, DSG3, ITGB4, KRT5, KRT10 MAPK útvonal: FGFR2, FGFR3, MAPK13 Sejtadhézió: SDC1
ALDH2, ARHGEF4, ASS1, AURKA, BCL11B, CA2, EGFR, ETS2, GATA3, GJA1, KLF4, KLF5, LAMA3, LGALS7, MAF, PTGS1, SCNN1A, SERPINB3, SLC2A1, SPP1, THBD, TPSAB1, WNT5A	Daganatfejlődés, sejtmozgás, sejtosztódás	Metabolizmus: ALDH2, ASS1, CA2, PTGS1 Citoszkeletális átrendeződés: ARHGEF4 Sejtciklus: AURKA Adherens kapcsolat:EGFR Axonfejlődés:ETS2 Sejtkommunikáció:GJA1,LAMA3, SPP1 Hemosztázis: THBD WNT útvonal: WNT5A
AHNAK, ANKRD57, CA12, CD24, CXADR, DEFB1, EPHB6, EPPK1, EVA1, FGFR2, FZD10, GABRE, GJB3, GRHL2, PRSS, SDC1, SERPINB5, SPINK5	Daganatfejlődés, morfológia, sejtmozgás	Metabolizmus: CA12 Hemopoetikus sejt: CD207 Axon: EPHB6 MAPK útvonal: FGFR2 WNT útvonal: FZD10 Neuroaktív ligand-sejt interakció: GABRE, PRSS3 Sejtkommunikáció: GJB3 Sejtadhézió: SDC1
BICD2, C20ORF42, CD207, CDKN1C, COL4A6, COL7A1, CST6, CSTA, FCER1A, KLK11, KRT1, LAD1, LY6D, PDZK1IP1, SPINT2, SPRR1A, ST14	Sejtosztódás és növekedés	Sejtkommunikáció: COLA7A1, KRT1
ABLIM1, AKR1B10, CENTD1, CXCL14, DSC3, EFS, F2RL1, FGF2, GJA1, IMPA2, KLK8, KRT15, LTB4R, MAP7, RORA, VSNL1	Sejt-sejt interakció, jelátvitel, sejtproliferáció	Axon: ABLIM1 Metabolizmus: AKR1B10, IMPA2 Citokin-ligand interakció: CXCL14 Sejtkommunikáció: DSC3, GJA1, LFRT15 MAPK útvonal: FGFR2 Neuroaktív ligand interakció: F2RL1, LTB4R
AKR1C1, AKR1C2, AQP3, BCL11A, CKMT1B, CTNNBIP1, EHF, GNA15, IGF1, JUP, LOR, NMU, PKP3, SCEL, SPRR1B, TACSTD2	Sejtfejlődés	Metabolizmus: AKR1C1, AKR1C2, CTKMT1B WNT útvonal: CTNNBIP1 Kalcium jelátvitel: GNA15
AIM1, CLTB, CPA3, DGKA, FAT2, KRT15, LYPD3, MYO6, PAK6, PERP, PTGS1, TUBB4	Sejtciklus	Huntington betegség: CLTB Sejtkommunikáció: KRT15 Metabolizmus: DGKA, PTGS1 Fokális adhézió: PAK6 Gap junction: TUBB4
CALML3, CALML5, CCRL1, PRSS8, SDC1, SPP1, THBD	Sejtmozgás, sejt-sejt interakció	Kalcium jelátvitel: CALML3 Sejtadhézió: SDC1 Sejtkommunikáció: SPP1 Hemosztázis: THBD

Mandruzzato által azonosított elváltozásokkal nem találtunk közös alterációt. Az eredményeink Jaeger tanulmányával mutatták a legnagyobb hasonlóságot, az általuk kimutatott 308 gén közül 212 volt a közös gén a mi adatainkkal. Jaeger és munkacsoporja a primer melanomák és metasztázisok génexpressziós eredményeit hasonlította össze. Háromszáznyolc szignifikánsan eltérő expressziójú gént detektáltak a két csoport között. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, a melanoma metasztázis minták expressziós mintázata a rosszabb prognózisú csoportéhoz hasonlított, és a 308 gén nagyrésze alulműködését figyelték meg a metasztázisokban.

A 212 közös génből mindössze három: az aurora kináz (AURKA), a szulfatáz 1 (SULF-1) és az osteopontin (OPN) mRNS szintje nőtt meg a rossz prognózisú daganatokban. Közülük az általunk analizált mintákban a legnagyobb, 5.622-szeres expressziós változást az osteopontin esetében figyeltünk meg. A többi gén alulműködése jellemezte a rossz prognózisú daganatokat, ugyanakkor a génexpressziós szint emelkedést detektáltunk a jobb prognózisú nem ulcerált felszínű melanomákban. A 212 gén funkcionális szerepét a 22-es táblázatban foglaltuk össze. A gének funkcióját vizsgálva kimutattuk, hogy többségük a bőr- és szőrfejlődési funkció, dermatológiai betegségek, daganatfejlődés, sejtmozgás, sejtosztódás a sejtciklus, sejt-sejt interakció és sejtmotilitás szabályozó folyamatokhoz tartozik, a p53, ERK/MAP, IP3/AKT és WNT/ β katenin, Nf- κ B molekulási útvonalakon hatva.

A saját és irodalomban leírt génexpressziós vizsgálatok eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a melanoma génexpressziós vizsgálataira vonatkozó adatok igen heterogének. Ennek oka az eltérő microarray platformok és biostatistikai megközelítések használatán túl, a daganatok expressziós adatainak különböző kontrol mintákhoz történő hasonlítása, valamint az analízis során a melanoma minták eltérő, nem a TNM besorolásnak megfelelő csoportosítása.

Az utóbbi években számos munkacsoport különböző metasztatizáló képességgel rendelkező sejtvonalak, valamint eltérő agresszivitású daganat csoportok közötti génexpressziós eltéréseket vizsgálva, a mi eredményeinkhez hasonlóan, kimutatta, hogy a melanoma progresszió korai stádiumában, a jobb prognózisú mintákban a gének fokozott működése, a késői stádiumú mintákban a gének alulműködése jellemző. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a különböző útvonalakban bekövetkezett specifikus génexpressziós mintázat elvesztése kulcslépés lehet az előrehaladott stádiumú, rossz prognózisú melanoma kialakulásában.

EGFR genetikai és expressziós eltéréseinek melanoma progresszióban betöltött szerepe

Az aktivált EGFR receptor különböző jelátviteli útvonalakon keresztül hatva serkenti a sejtosztódás, angiogenezis folyamatát, továbbá szerepet játszik a daganatsejtek inváziójában, metasztázis képzésében és gátolja a sejtek apoptózisát⁷⁶. A daganatsejtek felszínén található, gyakran megnövekedett expressziót mutató sejtfelszíni növekedési faktorok receptorai, köztük az EGF receptor, a daganat ellenes terápia fontos target molekulája. Egyes tüdődaganatoknál kolorektális daganatoknál sikerrel alkalmazott, ma már gyógyszernek minősülő gátlószeres és kis molekulák alkalmasak lehetnek a hasonló eltéréseket (EGFR amplifikáció, mutáció) mutató melanomák kezelésére is.

Annak ellenére, hogy az EGF receptor sejtfelszíni túlzott expresszióját először melanomában írták le, a fehérje expresszió eltéréseire, illetve azok melanoma progresszióban betöltött szerepére vonatkozó irdalmi adatok ellentmondásosak⁴³. Egyes kutatók a primer melanomák illetve melanociták sejtfelszíni EGFR fehérje hiányáról számolnak be^{44, 45}, ezzel szemben más munkacsoportok primer és metasztázis melanomákon az EGFR fehérje túlzott mértékű kifejeződését figyelték meg^{77, 78}. Az EGFR gén a 7p12 lokuszon lokalizálódik. Trent és mtsai. a 7-es kromoszóma kópiaszám eltérését vizsgálva megállapították, hogy a kromoszóma poliszómiája melanomákban rossz prognózissal és csökkent túléléssel szignifikáns mértékben társul⁴⁷.

A 7-es kromoszóma eltéréseinek prognosztikai jelentőségét számos más tanulmányban is bizonyították, ugyanakkor az EGFR onkogén amplifikációját egyedi sejtek szintjén nem vizsgálták^{46, 47 79, 80}. Kísérleteink során célunk volt az EGFR génamplifikáció mértékének karakterizálása primer melanomákban FISH-el, a génamplifikáció és daganatprogresszió közötti kapcsolat elemzése, valamint a DNS szintű eltérések gén- és fehérjeexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata.

FISH vizsgálataink során a 7-es kromoszóma poliszómiáját mutattuk ki a daganatok 57%-ában, mely szignifikáns mértékben asszociálódott a génamplifikációjával ($p < 0.001$). Az EGFR gén számbeli eltérését 64 (79%) lézióban figyeltük meg, a primer melanomák többségére a gén kismértékű amplifikációja volt jellemző. Az EGFR nagymértékű amplifikációja ritka jelenség melanomákban, mindössze az esetek 7%-át érintette a szignálok jellegzetes, klaszteres elrendeződése. Hasonló amplifikációs mintázat jellemzi a kissejtes tüdő és nyelőcső karcinómákat⁸¹, míg a gyomor és vastagbél daganatoknál, valamint glioblasztómánál az EGFR szignálok ún. „apró, parány” kromoszóma fragmentek formájában amplifikálódnak⁸².

Az EGFR gén emelkedett kópiaszáma mellett, a gén 7-es kromoszómához viszonyított vesztését is leírták. Az EGFR gén delécióát először vastagbél daganatokban mutatták ki a vizsgált minták 8%-ában, mindegyik lézióban a fehérje túlzott mértékű expressziójával társult⁸³. Az EGFR gén deléció magasabb százalékban fordult elő emlőkarcinómákban (16.6%), ebben az esetben nem találtak összefüggést a gén vesztés és a fehérje kifejeződés mértéke között⁸³.

Primer melanoma minták 9%-ában mutattuk ki az EGFR gén relatív delécióját, mely nem társult a gén- illetve fehérje expressziójának változásával. Ha az extra kópiával rendelkező melanomák mRNS expressziós szintjét hasonlítottuk a nem amplifikált minták génexpressziós szintjéhez, a minták 77%-ban az mRNS szint emelkedését figyeltük meg. A legnagyobb, több mint háromszoros expressziós változást mutató minta sejteinek 64%-ában EGFR extra kópiát találtunk FISH-el. Hasonló tendenciát figyeltünk meg további 4 lézióban, bár a gén amplifikációjának az EGFR mRNS és a fehérje expresszió mértéke között a korreláció nem volt lineáris.

A legtöbb primer mintában annak ellenére, hogy sokszor a daganatsejtek jelentős százaléka EGFR gén többletet hordozott a gén által kódolt fehérje sejt felszíni expresszióját nem tudtuk kimutatni. A fehérje expresszió hiányának egyik lehetséges oka a gén promóter régióját érintő aberráns metilációs mintázat. Ez az epigenetikai változás megakadályozza a transzkripciós faktorok kötődését a promóter régióhoz, ezáltal a génről nem szintetizálódik mRNS, így az extra kópiák jelenléte nem eredményezi az mRNS illetve a fehérje szintjének emelkedését. Az EGFR gén promóterének hipermetilációját számos daganatban leírták már, melanomára vonatkozóan még nem áll rendelkezésre adat^{84 85}. Egy másik elmélet szerint a jelátviteli útban egy „downstream” génben bekövetkező mutáció (pl:RAS) már elegendő az EGFR közvetlen érintettsége nélkül, az EGFR útvonal folyamatos aktivációjához.

Chung CH. és mtsai. szerint az is elképzelhető, hogy az EGFR FISH-el kimutatott prognosztikai jelentőségén túl, a genetikai instabilitásból adódóan a 7-es kromoszómán elhelyezkedő további gének koamplifikációnak is jelentős szerepe van. Ezt a feltételezést alátámasztják azok a kromoszómasávozásos és CGH adatok, melyek a 7-es kromoszómát érintő gyakori, rossz prognózissal társuló elváltozásokról számolnak be a melanoma progressziója során.

Az EGFR melanoma progresszióban betöltött szerepére vonatkozóan fontos megfigyelés, hogy a melanomás betegek 91%-ában megemelkedett EGF szintet találtak a betegek szérumában, ez az EGF receptor sejt felszíni részének leválása miatt következhet be, melyet

proteolítikus hatás idézhet elő. A mechanizmus háttérében álló pontos mechanizmus még nem tisztázott⁸⁶.

A sporadikus melanoma minták mellett, különböző metasztatizáló képességgel rendelkező melanoma sejtvonalak EGFR és 7-es kromoszóma kópiaszám eltéréseit, valamint a sejtfelszíni és a sejten belüli foszforilált fehérje expresszióját is vizsgáltuk. Két sejtvonalban a gén nagymértékű amplifikációját mutattunk ki, ehhez az EGFR mérsékelt expressziója társult. Az aktivált receptor jelenlétét mindössze egy sejtvonalban detektáltuk, a pEGFR nagyon alacsony mennyisége EGF ligand kezelést követően sem emelkedett. Hasonlóan a mi eredményeinkhez Ivanov és mtsai. sem tudtak kimutatni fehérje expressziót az analizált melanoma sejtvonalakon⁴⁵. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a gén kópiaszám eltérései és a receptor sejtfelszíni domén expresszió illetve intracelluláris foszforiláltsága között nincs szoros összefüggés.

Az EGFR gén kópiaszám eltéréseire elemzett primer melanoma minták száma elegendő nagy volt ahhoz, hogy statisztikai módszerekkel analizáljuk a gén számbeli eltérései és a daganatok klinikopatológia paraméterei közötti összefüggéseket. Megfigyelésünk szerint deléció és kismértékű amplifikáció szignifikánsan nagyobb mértékben fordult elő férfi betegekből származó melanomákban. Hasonlóan szignifikáns asszociációt találtunk a 4 mm-nél vastagabb tumorvastagság és a felszíni kifeléyesedés valamint az EGFR gén többlet között. Szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a daganatok metasztázisképzése és az EGFR emelkedett géndózis között. A követési időn belül metasztázist képző léziókra a gén kis- és nagymértékű amplifikációja egyaránt jellemző elváltozás. A tumorsejtekben kimutatott EGFR extra kópia a betegek rövidebb túlélésével társult. A fenti adatok alapján megállapíthatjuk, hogy az EGFR gén többlete összefüggésben áll malignus melanomák rossz prognózisával.

Az utóbbi időben a nem kis sejtes tüdő tumorok EGFR terápia iránti érzékenységét vizsgálva megfigyelték, hogy az EGFR gén FISH-el kimutatott amplifikációs státusza is fontos prediktor lehet a receptor tirozinkináz aktivitása mellett a terápia hatékonyságát illetően⁸⁷. Azoknak a betegeknek sokkal jobb a gefitinib iránti érzékenysége és ezáltal a túlélési esélyei, akiknek daganatai EGFR amplifikációt és a 7-es kromoszóma poliszómiát tartalmaznak⁸⁷.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy eredményeink alapján, a korábbi irodalmi adatokkal egyezően, primer melanomákban a 7-es kromoszóma poliszómiája rossz prognózissal társul. Elsőként írtuk le az EGFR gén sejt szintű eltéréseit és klinikopatológiai paraméterek közötti kapcsolatot nagyszámú melanoma mintán. A primer léziók több mint 50 %-ában EGFR gén többletet találtunk. A géntápuszra jellemző extrakópia legtöbbször kismértékű fehérje expresszióval társult, a génamplifikáció, más daganatokkal ellentétben, nem eredményezte az

EGFR fehérje fokozott mértékű kifejeződését. Eredményeink alapján az EGFR amplifikáció primer melanomák metasztázis képző hajlamára prognosztikai jelentőséggel bírhat. Primer melanomák EGFR eltéréseinek klinikai relevanciájához szükséges az mRNS- fehérje- és génkópiaszám eltérések szimultán analízise, különösen azokban a mintákban melyek EGFR extra kópiát tartalmaznak. Az EGFR extra kópiaszámmal összefüggő molekuláris eltérések további vizsgálatokat sürgetnek, melyek célja lehet, annak kiderítése, hogy azoknál a melanomás betegeknél, akik daganata EGFR kópiaszám eltérést hordoz, hasonlóan, mint ahogyan az bebizonyosodott más daganatoknál, hatásos lehet-e az anti EGFR immun illetve gefitinib terápia.

9p21 lokusz deléció karakterizálása fluoreszcencia *in situ* hibridizációval intrefázisos melanoma sejtekben

Az EGFR gén eltéréseket a daganat progresszió késői szakaszához rendelik, ugyanakkor a 9-es kromoszóma rövid karjának deléciója korai elváltozásnak számít a melanoma tumorigenezisében. Nemcsak a korai stádiumú primer melanomákban de már az atípusos naevusokban is megfigyelték. A gén eltéréseit legtöbb tanulmányban melanoma sejtvonalakon és melanoma metasztázisokon vizsgálták különböző molekuláris biológiai módszerekkel^{88, 89}.

Diszplasztikus és melanoma asszociált naevusban a 9p21 lokusz különböző régióinak deléciójáról, heterozigóta vesztéséről számos tanulmány beszámolt, ezek az eredmények a 9p21 melanoma genézisben betöltött központi szerepére hívják fel a figyelmet⁹⁰. Eddig összesen két FISH tanulmány jelent meg a 9p21 eltéréseinek sejt szinten történő vizsgálatával^{88, 89}. Casorco és mtsai. 30 melanocitás naevust analizáltak 9-es és 9p21 specifikus DNS próbával, eredményeik a melanoma asszociált naevusokban a 9p21 nagyarányú vesztését mutatták. Ez a 9p21 deléció informatív szerepét hangsúlyozza a malignusan traszformált közönséges és diszplasztikus naevusok azonosításában, mivel a 9p21 vesztés egy korai történés a melanoma progressziójában és már azelőtt bekövetkezik mielőtt a szövettanilag a malignus fenotípus kialakulna. Az irodalmi adatok a 9p21 melanoma progresszióban beöltött szerepére vonatkozóan ellentmondásosak. Egyes tanulmányok szerint a CDKN2A expresszió csökkenése a melanomasejtek invazivitásának és metasztatizáló képességének növekedését vonja maga után⁹¹, ezzel szemben más analízisek nem figyeltek meg ehhez hasonló korrelációt²⁹.

Nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre primer melanomák 9p21 citogenetikai alterációira vonatkozóan. A 9p21-es régió eltérései és a klinikopatológiai paraméterek közötti összefüggést melanoma mintákon eddig még nem vizsgálták. Ezért kísérleteink célja volt a 9p21 lokusz jellemző eltéréseinek karakterizálása azonosítása egyedi sejtek szintjén, az alterációk melanoma progresszióban betöltött szerepének elemzése. Vizsgáltuk továbbá a 9p21-es tumorszuppresszor lokuszon lokalizálódó, a sejtciklus szabályozásában alapvető szerepet játszó p16 (CDKN2A) gén, mRNS szint és a lokusz kópiaszám eltérései közötti kapcsolatot.

Az irodalmi adatokkal egyezően a 9-es kromoszóma delécióját a daganatok jelentős százalékában kimutattuk^{24, 92, 93}. A deléció jellegzetessége, hogy a progresszió korai és késői fázisában egyaránt megfigyelhető. Alapvető jelentőségű a daganatok molekuláris klasszifikációja szempontjából az a megfigyelés, hogy a felszínesen terjedő melanomákban gyakrabban mutatható ki a 9-es kromoszóma vesztese, mint a nodulárisban, ami arra utal, hogy a biológiai viselkedés szerint elkülönülő hisztológiai altípusok a molekuláris alterációk szintjén is eltérnek. A Koyonova és mtsa. által nemrég közölt adatok szerint azok a noduláris primer melanomák, amelyekre egyidejűleg a CDKN2A gén deléciója és a CMYC gén extra kópia száma jellemző kevésbé malignus tulajdonságúak⁸⁸. Sajnos az SSM melanomákra nem közöltek adatokat. Az analizált melanoma mintáinkban, mások adataihoz hasonlóan^{91, 94}, egyértelmű homozigóta deléciót a daganatok kis százalékában (8.7%, 6 NM és 1 SSM) mutattunk ki. Ugyanakkor ez a megfigyelés nem zárja ki, azoknak a delécióknak, pontmutációknak a jelenlétét, melyeket FISH-el nem lehet kimutatni. A 9p21 régió 9-es kromoszómához viszonyított relatív vesztese hasonló gyakorisággal fordult elő mindkét altípusban. A 9p21 delécióját a melanoma minták 82%-ában figyeltük meg. Kvantitatív-PCR adataink alapján a lokusz homozigóta deléciója az itt lokalizálódó CDKN2A tumorszuppresszor gén csökkent expresszióját vonja maga után.

Szolid tumorok közül a CDKN2A gént érintő elváltozások gyakoriak a glioblasztómák, hasnyálmirigydaganatok, hólyagrákok, melanomák esetében. Ezek az eltérések a gén szomatikus mutációját, delécióját, epigenetikus modifikációját foglalja magába⁹⁵⁻⁹⁹. A gén örökletes mutációját 10-20%-ban lehet kimutatni azokban a családokban, ahol melanomás megbetegedés halmozottan fordul elő^{77, 100}. Habár melanomára hajlamosító mutáció még nincs azonosítva, a familiáris melanomák több mint fele kapcsolatban áll a 9p21-es lokusz rendellenességeivel.¹⁰¹⁻¹⁰³ Ezek az adatok azt sugallják, hogy a 9p21-es lokuszon a CDKN2A tumorszuppresszor gén mellett, más melanoma kialakulására hajlamosító gén(ek) szerepével is számolnunk kell¹⁰⁴.

FISH adataink alapján megállapíthatjuk, hogy a 9p21-es kromoszóma szakasz veszítése mind progresszió a korai, mind a késői stádiumában lévő primer melanomákban gyakori jelenség, és nagymértékű szekvencia delécióját jelenti. Feltételezzük, hogy más kromoszómális eltérésekkel együtt nemcsak a daganat kialakulásában, de a progressziójában is szerepe van. Eredményeinket összefoglalva interfázisos FISH analízissel kimutattuk, hogy a 9p21 lokusz deléciója nemcsak melanoma sejtvonalakra jellemző, de gyakori citogenetikai eltérés sporadikus primer melanomákban is. Megfigyeléseink nemcsak megerősítik az eddigi irodalmi adatokat, hanem bizonyítékot is szolgáltat arra, hogy a lokusz deléciója kilóbázis nagyságú már a korai stádiumú daganatokban is.

Eddig nem közölt új megfigyelésünk, hogy a 9p21 tumorszuppresszor lokusz nemcsak deléciója hanem a lokusz kismértékű amplifikációja is megfigyelhető.

Összefoglalás

A dolgozatban szereplő vizsgálatok fő célja a humán melanoma progressziójában szerepet játszó genetikai és génexpressziós eltérések tanulmányozása, az eltérések klinikopatológiai paraméterekkel történő korrelációs analízise volt.

1. Primer melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő génexpressziós eltéréseket vizsgálva, szignifikáns mértékű expressziós változást mutattunk ki a daganatok felszínének kifeléyesedésével (ulceráció) és a melanomák metasztatázisképző tulajdonságával.
 - Ulcerációval összefüggő mRNS szint változást 1095 génnél figyeltünk meg, gének többsége az ulcerált felszínű melanomákban csökkent expresszióval társult. Ugyanezen gének megnövekedett expressziós szintjét detektáltuk a nem kifeléyesedő felszínű melanoma mintákban.
 - A rossz prognózisú melanomákban a legmagasabb expressziós átlagértéket az osteopontin génre mutattunk ki. A jobb prognózisú daganatokban legnagyobb mértékben a defenzin β szintje emelkedett meg, mind az OPN mind a defenzin β az Nf- κ B transzkripció faktor indukcióját okozza.
 - Az ulcerált felszínű melanomákban csökkent expressziójú gének funkcióját vizsgálva kimutattuk, hogy többségük a bőr- és szőrfejlődési funkció, dermatológiai betegségek, daganatfejlődés, sejtosztódás a sejtciklus, sejt-sejt interakció és sejtmotilitás szabályozó folyamatokhoz tartozik, a p53, ERK/MAP, IP3/AKT és WNT/ β katenin, Nf- κ B molekulási útvonalakon hatva.
 - Array CGH és génexpressziós adatainkat összehasonlítva, a génexpressziós szint csökkenés hátterében a vizsgált géneknél megállapítottuk, hogy nem az adott kromoszómális szakasz deléciója áll.
2. Hierarchikus klaszter analízissel kimutattuk, hogy a nyirokcsomó metasztatázisok génexpressziós mintázata rossz prognózissal jellemezhető primer melanomák génexpressziós profiljához hasonló.

3. Saját adatainkat összehasonlítva irodalmi génexpressziós eredményekkel, 212 melanoma progresszióval összefüggő génexpressziós változást mutató közös gént azonosítottunk.
4. Interfázisos FISH analízissel kimutattuk, hogy az EGFR génkópiaszám többlete, primer melanomákban rossz prognózissal társul.
 - Deléció és kismértékű amplifikáció szignifikánsan nagyobb mértékben fordult elő férfi betegekből származó melanomákban.
 - Az EGFR gén kópiaszáma szignifikánsan magasabb a 4,01 mm-nél vastagabb Breslow vastagságú daganatokban.
 - A követési időn belül metasztázist képző léziókra a gén kis- és nagymértékű amplifikációja egyaránt jellemző elváltozás. A tumorsejtekben kimutatott EGFR extra kópia a betegek rövidebb túlélésével társul.
 - Hasonlóan szignifikáns asszociációt mutattunk ki a daganatok felszíni kifehélyesedése valamint az EGFR gén többlet között.
5. A gén amplifikációs státusza és az EGFR mRNS valamint a fehérje expresszió mértéke között nem volt lineáris korreláció.
 - A léziókban az EGFR fehérje kismértékű expresszióját vagy annak teljes hiányát figyeltük meg függetlenül a minták EGFR gén kópiaszámától és az mRNS expresszió szintjétől.
6. A 19-es exon aktivációs mutációt, ami más daganatok jellegzetes alterációja, egyetlen melanoma mintában sem detektáltuk.
7. FISH vizsgálataink során kimutattuk, hogy a 9p21 vesztés gyakori eltérés sporadikus primer melanomákban.
 - A 9p21-es lokusz delécióját mind a korai, mind a késői melanomákban megfigyeltük.
 - A 9p21 deléciója mellett a lokusz kópiaszám többletét is kimutattuk.
 - Nem találtunk szoros korrelációt a 9p21-es lokusz genetikai eltérései és a daganatok klinikopatológiai tulajdonságai között.

Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

Rákosy Zs., Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Vokó Z., Bégány Á., Gallai M., Szentirmay Z., Barok M., Krekk Zs., Ádány R. and Balázs M.: EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis (International Journal of Cancer, 2007 Oct 15;121(8):1729-37.)

IF: 4.693

Rákosy Zs., Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Bégány Á., Emri G., Ádány R. and Balázs M.: Characterization of the 9p21 copy number alterations in human melanoma by fluorescence in situ hybridization (nyomtatás alatt, Cancer Genetics and Cytogenetics, 2008)

IF: 1.544

Rákosy Zs., Bégány Á., Ádány R. and Balázs M.: Characterization of global gene expression and gene copy number alterations in human malignant melanoma by microarray techniques (kézirat)

Egyéb *in extenso* közlemények

Treszl A., Ádány R., **Rákosy Zs.**, Kardos Bégány Á., Gilde K., Balázs M.: Extra copies of c- myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanoma has revealed by fluorescence in situ hybridisation. Cytometry. 2004;60B(1):37-46.

IF: 2.065

Toida M., Balázs M., Treszl A., **Rákosy Zs.**, Kato K., Yamazaki Y., Matsui T., Suwa T., Hatakeyama D., Makita H., Mori S., Yamashita T., Shibata T., Ádány R.: Analyses of Ameloblastomas by Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence in situ Hybridization. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2005; 159(2):99-104

IF: 1.544

Juhász A, Balázs M., Sziklay I, **Rákósy Zs.**, Treszl A., Répássy G., Ádány R: Genetic divergence between laryngeal and hypopharyngeal tumors by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization *Cytometry* 2005; 67(2):151-160.

IF: 2.065

Treszl A., **Rákósy Zs.**, Ladányi A., Ádány R., Balázs M.: Complex cytogenetic analysis of a new metastatic melanoma cell line. *Frontiers in Bioscience* 2006;11:1844-1853.

IF: 2.771

Székvölgyi L., **Rákósy Zs.**, Bálint L B., Kókai E., Imre L., Vereb Gy., Bacsó Zs., Goda K., Varga S., Balázs M, Dombrádi V., Nagy L. and Szabó G.: Ribonucleoprotein-masked nicks at the borders of interphase chromatin loops (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 18;104(38):14964-14969)

IF: 9.643

Barok M., Balázs M., Nagy P., **Rákósy Zs.**, Treszl A., Tóth E., Juhász I., John W. Park, Jorma Isola, Vereb Gy., Szöllősi J.: Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor (nyomtatás alatt, *Cancer Letters* 2007)

IF: 3,227

Juhász A., Sziklai I., **Rákósy Zs.**, Ecsedi Sz., Ádány R. and Balázs M.: Characterization of the role of tenascin and MMP-9 during cholesteatoma progression (elbírálás alatt)

Töröcsik D., Széles L., Paragh Gy., **Rákósy Zs.**, Balázs M., Nagy L., Inbal A. and Ádány R.: Evidence for a role of Factor XIII-A in gene expression regulation in alternatively activated human macrophages (elbírálás alatt)

Barok M., Balázs M., Lázár V., **Rákósy Zs.**, Tóth E., Treszl A., John W. Park, Vereb Gy., Szöllősi J.: Characterization of a trastuzumab resistant novel breast cancer cell line by CGH and FISH (kézirat)

Ecsedi Sz., **Rákósy Zs.**, Vízkeleti L., Juhász A., Sziklay I., Ádány R. and Balázs M.: Chromosomal imbalances are associated with increased proliferative activity and might play an important role in the bone destruction of acquired cholesteatoma (kézirat)

Idézhető absztraktok

Balázs M., **Rákósy Zs.**, Treszl A., Bégány Á., Ádány R.: Interphase cytogenetic analysis shows frequent hemizygous and homozygous deletions of p16/MTS1/CDKN2A tumoursuppressor gene in sporadic primary melanomas. *Cytometry*,2004;59A:69

Rákósy Zs., Vízkeleti L., Bégány Á., Ádány R., Balázs M.: Amplification of the EGFR gene and the 7q31 locus are associated with metastasis formation of malignant melanomas *The FEBS Journal* Volume 272 Supplement 1, July 2005

Rákósy Zs. Vízkeleti L. Treszl A., Ádány R., Balázs M.: Az EGFR gén (7p12) és a 7q31 lokusz amplifikáció szerepének tanulmányozása primer melanomák metasztázisképzésében; *Onkológia* 2005, 49

Ecsedi Sz., Vízkeleti L., **Rákósy Zs.**, Juhász A, Ádány R., Balázs M: Cholesteatomák kromoszóma eltéréseinek vizsgálata interfázisos sejtekben; *Onkológia* 2005, 49

Előadások és Poszterek

Rákósy Zs.: Melanoma sejtvonalak interfázisos FISH analízise centroméra- és génspecifikus DNS próbákkal; Előadás; XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 2003. Debrecen, Morfológia-Pathomorfológia, Celluláris és Képpalkotó Diagnosztika szekció

Treszl A, Ladányi A, **Rákósy Zs**, Buczkó Zs, Ádány and Balázs M: Establishment and cytogenetic characterization of a new melanoma cell line by CGH and FISH; Poszter; 3rd EUROSkin Conference, Stockholm 2003

Rákósy Zs., Treszl A., Bégány Á., Ádány R. és Balázs M.: Az EGFR gén (7p12) amplifikáció szerepének tanulmányozása primer melanomák metasztázisképzésében; Poszter; IV. Sejtanalitikai Konferencia 2004. május 6-8. Budapest

Balázs M, **Rákósy Zs.**, Treszl A., Bégány Á., Ádány R.:Interphase cytogenetic analysis shows frequent hemizygous and homozygous deletion of p16 tumoursuppressor gene in sporadic primary melanomas; Előadás; XXII International Congress of the International Society for Analytical Cytology (ISAC) Montpellier, Franciaország, 2004

Treszl A., **Rákósy Zs.**, Ladányi A., Ádány R., Balázs M.: Comparative analysis of melanoma cell lines; Poszter; XVIII Conference of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Ausztria 2004

Rákósy Zs.: A 9p21-es lokusz homo- és heterozigóta deléciója malignus melanomákban; Előadás , Helyi Ph.D. konferencia, 2005. február 17. Debrecen

Molnár Zs., **Rákósy Zs.**, Treszl A., Balázs M., Bazsáné Kassai Zs., Kovács T., Jakab A.: Spermiumon végzett FISH vizsgálatokkal szerzett tapasztalataink; Előadás , Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság -MART- V. Nemzeti Kongresszusa 2005. április 22-23 Visegrád

Rákósy Zs.: Primer melanomák genetikai eltéréseinek analízise kromozómális és array CGH technikával; Előadás; Tavaszi Szél konferencia, 2005. május 5-8 Debrecen

Rákósy Zs., Treszl A, Bégány Á., Ádány R., Balázs M : Characterisation of 9p21 deletion in late stage primary melanomas; Poszter; FEBS Forum of Young Scientists June 30-July 2, Visegrád

Rákósy Zs, Vízkeleti L., Bégány Á, Ádány R és Balázs M: Amplification of the EGFR gene and the 7q31 locus are associated with metastasis formation of malignant melanomas; Poszter; 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference 2-7 July 2005 Budapest

Rákósy Zs, Vízkeleti L., Bégány Á., Ádány R. and Balázs M: Amplification of the 7q31 locus is a frequent event in malignant melanoma and associated with extra copies of EGFR gene; Poszter; ECCO 13 EACR Congress- Paris, 30 October - 3 November 2005

Ecsedi Sz., Vízkeleti L., **Rákósy Zs.**, Juhász A, Ádány R., Balázs M: Cholesteatomák kromozóma eltéréseinek vizsgálata interfázisos sejtekben; Poszter; A Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa 2005. november 10-12. Budapest

Rákósy Zs., Vízkeleti L., Treszl A., Ádány R., Balázs M.: Az EGFR gén (7p12) és a 7q31 lokusz amplifikáció szerepének tanulmányozása primer melanomák metasztázisképzésében; Előadás; A Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa 2005. november 10-12. Budapest

Balázs M., **Rákósy Zs.**, Treszl A., Bégány Á., Ádány R.: Whole genome screen of primary melanomas by array CGH; Poszter; ISAC XXIII International Congress May 20-24, 2006 Québec City Convention Center, Québec City, Canada

Rákósy Zs.: Malignus melanomákban az EGFR-gén amplifikációja rossz prognózzal társul, és nem asszociálódik az EGF-receptor sejt felszíni fehérje overexpressziójával; Előadás, Helyi Ph.D. konferencia, 2006. április 10-14 Debrecen

Békési Gy., Horváth G., **Rákósy Zs.:** Humán spermiumok diploidia gyakoriságának meghatározása áramlási citometriával; Előadás; Helyi Ph.D. konferencia, 2006. április 10-14 Debrecen.

Székvölgyi L., **Rákósy Zs.:** A sejtmag mátrixon kimutatható nick-klaszterek szerepe a kromatin hurok szerveződésében és a hurok-méretű DNS fragmentációban; Előadás; Helyi Ph.D. konferencia, 2006. április 10-14 Debrecen.

Rákósy Zs., Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Bégány Á., Ádány R., Balázs M.: Primer malignus melanomák génextpressziós mintázatának elemzése microarray technikával; Poszter; V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2006, május 4-6, Budapest

Vízkeleti L., Ecsedi Sz., **Rákósy Zs.**, Bégány Á., Ádány R., Balázs M.: A 7q31-es lokusz alterációi humán malignus melanomákban; Poszter; V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2006, május 4-6, Budapest

Ecsedi Sz., Vízkeleti L., **Rákósy Zs.**, Juhász A., Ádány R., Balázs M.: Az eltérő biológiai viselkedésű cholesteatomák citogenetikai elemzése interfázisos FISH analízissel; Poszter; V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2006, május 4-6, Budapest

Vida A., **Rákósy Zs.**, Treszl A., M. Toida, Ádány R., Balázs M.: Gyakori deléciók ritka, jóindulatú szájüregi daganatokban; Poszter; V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2006, május 4-6, Budapest

Balázs M., Lázár V., **Rákósy Zs.**, Ádány R. Genome-wide array comparative genomic hybridization reveals novel alterations in malignant melanoma. Előadás; EACR conference, July 4-8 2006 Budapest

Balázs M., Lázár V., **Rákósy Zs.**, Barok M., Treszl A., Park J., Szöllösi J. Characterization of a Herceptin® resistant novel breast cancer cell line by CGH and FISH. Poszter; Marie-Curie Conferences and training courses on arrayCGH and molecular cytogenetics, 13 - 16 September 2006, Leuven

Székvölgyi L., **Rákósy Zs.**, Bálint L B., Bacsó Zs., Goda K., Balázs M., Nagy L. and Szabó G. Regularly spaced nicks delimit chromatin loops. Poszter; Conference on Dynamic Organization of Nuclear Function, New York, Cold Spring Harbor Laboratory 2006:

Rákósy Zs., Ádány R., Balázs M.: Primer melanoma malignum klasszifikációja génextpressziós mintázat alapján; Poszter; VII. Magyar Genetikai Kongresszus /XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2007. április 15-17 . Balatonfüred

Székvölgyi L., **Rákósy Zs.**, Bálint L B., Bacsó Zs., Goda K., Vereb Gy., Varga S., Balázs M., Nagy L. and Szabó G.: Egyszál folytonossági hiányok szerepe a kromatinhurkok kialakításában és pathológiás génátrendeződésekben; Előadás; VII. Magyar Genetikai Kongresszus /XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2007. április 15-17 . Balatonfüred

Balázs M., Lázár V., **Rákósy Zs.**, Bégány Á., Emri G., Ádány R.: Melanoma progresszió genetikai markerei; Előadás; VII. Magyar Genetikai Kongresszus /XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2007. április 15-17 . Balatonfüred

Balázs M., Lázár V., **Rákósy Zs.**, Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Bégány Á., Emri G., Ádány R.: Array CGH and fluoreszcencia in situ hibridization analyses reveal new genomic alterations in malignant melanoma Saltzburg 2007

Rákósy Zs., Bégány Á., Emri G., Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Ádány R., Balázs M.: EGFR génamplifikáció szerepe a melanoma progresszió során; Előadás, 2007. december 13-15. Magyar Dermatológiai Társulat 80. Nagygyűlése, Budapest

Köszönet

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Balázs Margitnak, aki bevezetett a daganatkutatás és az in situ hibridizációs módszerek csodálatos világába, mindvégig irányította és segítette kutatómunkámat.

Köszönöm Ádány Róza professzornőnek, hogy lehetővé tette, hogy intézetében dolgozhassam.

Köszönöm Dr. Bégány Ágnesnek, a melanoma szövettana és klinikuma kapcsán nyújtott útmutatásait.

Köszönöm a Népegészségügyi Iskola Megelőző Orvostani Intézete minden munkatársának, hogy munkámat segítették. Külön köszönettel tartozom Kovács Györgynének asszisztensi segítségéért.

Szeretnék külön köszönetet mondani Ecsedi Szilvia és Vízkeleti Laura Ph.D. hallgatók segítőkész munkájáért.

Irodalomjegyzék

1. Elder D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncol* 1999;38:535-47.
2. Gilde K. [Naevus pigmentosus and melanoma]. *Magy Onkol* 2003;47:19-26.
3. Houghton AN, Real FX, Davis LJ, Cordon-Cardo C, Old LJ. Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J Exp Med* 1987;165:812-29.
4. Allen AC, Spitz S. Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer* 1953;6:1-45.
5. Gershenwald JE, Buzaid AC, Ross MI. Classification and staging of melanoma. *Clin Lab Med* 2000;20:785-815.
6. Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorthy K. Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res* 2000;10:303-12.
7. Mancianti ML, Herlyn M. Tumor progression in melanoma: the biology of epidermal melanocytes in vitro. *Carcinog Compr Surv* 1989;11:369-86.
8. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004;150:179-85.
9. Geller AC, Annas GD. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Semin Oncol Nurs* 2003;19:2-11.
10. de Vries E, Steliarova-Foucher E, Spatz A, Ardanaz E, Eggermont AM, Coebergh JW. Skin cancer incidence and survival in European children and adolescents (1978-1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* 2006;42:2170-82.
11. Pearce J, Barnett R, Kingham S. Slip! Slap! Slop! Cutaneous malignant melanoma incidence and social status in New Zealand, 1995-2000. *Health Place* 2006;12:239-52.
12. Wu XC, Chen VW, Steele B, Roffers S, Klotz JB, Correa CN, Carozza SE. Cancer incidence in adolescents and young adults in the United States, 1992-1997. *J Adolesc Health* 2003;32:405-15.
13. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuna MJ, Pajares R, Martinez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodriguez-Peralto JL. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004;164:193-203.
14. Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev* 1998;12:3467-81.
15. Boukamp P. UV-induced skin cancer: similarities--variations. *J Dtsch Dermatol Ges* 2005;3:493-503.
16. Bardeesy N, Kim M, Xu J, Kim RS, Shen Q, Bosenberg MW, Wong WH, Chin L. Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell Biol* 2005;25:4176-88.
17. Hurks HM, Metzelaar-Blok JA, Barthen ER, Zwinderman AH, De Wolff-Rouendaal D, Keunen JE, Jager MJ. Expression of epidermal growth factor receptor: risk factor in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2023-7.
18. Olah J, Dobozy A. [The new TNM classification of malignant melanoma]. *Magy Onkol* 2003;47:59-61.
19. Somlai B. [Clinical characteristics of melanoma metastasis]. *Magy Onkol* 2003;47:85-8.

20. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1295-306.
21. Fuchs SY. De-regulation of ubiquitin-dependent proteolysis and the pathogenesis of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:329-38.
22. Torabian S, Kashani-Sabet M. Biomarkers for melanoma. *Curr Opin Oncol* 2005;17:167-71.
23. Palmieri G, Casula M, Sini MC, Ascierto PA, Cossu A. Issues affecting molecular staging in the management of patients with melanoma. *J Cell Mol Med* 2007;11:1052-68.
24. Balazs M, Adam Z, Treszl A, Begany A, Hunyadi J, Adany R. Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization. *Cytometry* 2001;46:222-32.
25. Rodolfo M, Daniotti M, Vallacchi V. Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Lett* 2004;214:133-47.
26. de Wit NJ, Rijntjes J, Diepstra JH, van Kuppevelt TH, Weidle UH, Ruitter DJ, van Muijen GN. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. *Br J Cancer* 2005;92:2249-61.
27. Pavey S, Johansson P, Packer L, Taylor J, Stark M, Pollock PM, Walker GJ, Boyle GM, Harper U, Cozzi SJ, Hansen K, Yudt L, et al. Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. *Oncogene* 2004;23:4060-7.
28. Mirmohammadsadegh A, Baer A, Nambiar S, Bardenheuer W, Hengge UR. Rapid identification of dysregulated genes in cutaneous malignant melanoma metastases using cDNA technology. *Cells Tissues Organs* 2004;177:119-23.
29. Wang E, Panelli MC, Zavaglia K, Mandruzzato S, Hu N, Taylor PR, Seliger B, Zanovello P, Freedman RS, Marincola FM. Melanoma-restricted genes. *J Transl Med* 2004;2:34.
30. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004;64:5270-82.
31. Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Doroudi R, Gustrau A, Marini A, Roeder G, Ruzicka T, Hengge UR. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis identified by complementary DNA microarrays. *Arch Dermatol* 2005;141:165-73.
32. Gyorffy B, Lage H. A Web-based data warehouse on gene expression in human malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2007;127:394-9.
33. Zhou Y, Dai DL, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos EI, Dorocicz I, Tang L, Huntsman D, Nelson C, Ho V, Li G. Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 2005;124:1044-52.
34. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL, Federman S, Miller JR, 3rd, Allen RE, Singer MI, Leong SP, Ljung BM, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6092-7.
35. Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, Avril MF, Ortiz Romero PL, Robert T, Balacescu O, Eggermont AM, Lenoir G, et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:472-82.
36. Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringner M, Sauter G, Monni O, Elkahloun A, Kallioniemi OP, Kallioniemi A. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:6240-5.
37. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12963-8.

38. Gray JW, Kuo WL, Liang J, Pinkel D, van den Engh G, Trask B, Tkachuk D, Waldman F, Westbrook C. Analytical approaches to detection and characterization of disease-linked chromosome aberrations. *Bone Marrow Transplant* 1990;6 Suppl 1:14-9.
39. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-21.
40. Arteaga CL, Baselga J. Clinical trial design and end points for epidermal growth factor receptor-targeted therapies: implications for drug development and practice. *Clin Cancer Res* 2003;9:1579-89.
41. Koprowski H, Herlyn M, Balaban G, Parmiter A, Ross A, Nowell P. Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. *Somat Cell Mol Genet* 1985;11:297-302.
42. de Wit PE, Moretti S, Koenders PG, Weterman MA, van Muijen GN, Gianotti B, Ruiters DJ. Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *J Invest Dermatol* 1992;99:168-73.
43. Mueller BM, Romerdahl CA, Trent JM, Reisfeld RA. Suppression of spontaneous melanoma metastasis in scid mice with an antibody to the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 1991;51:2193-8.
44. Grahn JC, Isseroff RR. Human melanocytes do not express EGF receptors. *J Invest Dermatol* 2004;123:244-6.
45. Ivanov VN, Hei TK. Combined treatment with EGFR inhibitors and arsenite upregulated apoptosis in human EGFR-positive melanomas: a role of suppression of the PI3K-AKT pathway. *Oncogene* 2005;24:616-26.
46. Udart M, Utikal J, Krahn GM, Peter RU. Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia* 2001;3:245-54.
47. Trent JM, Meyskens FL, Salmon SE, Ryschon K, Leong SP, Davis JR, McGee DL. Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 1990;322:1508-11.
48. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet* 1999;21:128-32.
49. Kumar R, Smeds J, Berggren P, Straume O, Rozell BL, Akslen LA, Hemminki K. A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 2001;95:388-93.
50. Li S, Fang W, Zhong H. [Expression of tumor metastasis suppressor gene KAI1/CD82 in human cancer cell lines with different metastasis potential]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1999;79:708-10.
51. Ladanyi A, Timar J, Paku S, Molnar G, Lapis K. Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int J Cancer* 1990;46:456-61.
52. Treszl A, Ladanyi A, Rakosy Z, Buczko Z, Adany R, Balazs M. Molecular cytogenetic characterization of a novel cell line established from a superficial spreading melanoma. *Front Biosci* 2006;11:1844-53.
53. Juhasz A, Balazs M, Sziklay I, Rakosy Z, Treszl A, Repassy G, Adany R. Chromosomal imbalances in laryngeal and hypopharyngeal cancers detected by comparative genomic hybridization. *Cytometry A* 2005;67:151-60.

54. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol* 2002;12:183-90.
55. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207-11.
56. Bussey KJ, Kane D, Sunshine M, Narasimhan S, Nishizuka S, Reinhold WC, Zeeberg B, Ajay W, Weinstein JN. MatchMiner: a tool for batch navigation among gene and gene product identifiers. *Genome Biol* 2003;4:R27.
57. Harari PM. Anti-EGFR therapy update: clinical experience and adverse event insights. *Oncology (Williston Park)* 2006;20:3-4.
58. Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician* 2005;72:269-76.
59. Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C, Vitali M, Buzzoni R, Rixe O, Nova P, Aglione S, Taillibert S, Khayat D. Metastatic melanoma: chemotherapy. *Semin Oncol* 2002;29:427-45.
60. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-99.
61. Hampton GM, Frierson HF. Classifying human cancer by analysis of gene expression. *Trends Mol Med* 2003;9:5-10.
62. Jaeger J, Koczan D, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Gross G, Spang R, Kunz M. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin Cancer Res* 2007;13:806-15.
63. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536-40.
64. Smith AP, Hoek K, Becker D. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1018-29.
65. Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:44926-35.
66. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Level of interleukin-8 expression by metastatic human melanoma cells directly correlates with constitutive NF-kappaB activity. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:9-17.
67. Singh SK, Morbach H, Nanki T, Girschick HJ. Differential expression of chemokines in synovial cells exposed to different *Borrelia burgdorferi* isolates. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:311-22.
68. Richmond A, Lawson DH, Nixon DW, Chawla RK. Characterization of autostimulatory and transforming growth factors from human melanoma cells. *Cancer Res* 1985;45:6390-4.
69. Mrowietz U, Schwenk U, Maune S, Bartels J, Kupper M, Fichtner I, Schroder JM, Schadendorf D. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. *Br J Cancer* 1999;79:1025-31.
70. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J Immunol* 1992;148:1280-5.

71. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 2000;6:2573-81.
72. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* 1994;54:3242-7.
73. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, Gudas JM, Bar-Eli M. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 2002;161:125-34.
74. Mineshiba J, Myokai F, Mineshiba F, Matsuura K, Nishimura F, Takashiba S. Transcriptional regulation of beta-defensin-2 by lipopolysaccharide in cultured human cervical carcinoma (HeLa) cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:37-44.
75. Mandruzzato S, Callegaro A, Turcatel G, Francescato S, Montesco MC, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Rossi CR, Biccato S, Wang E, Marincola FM, Zanovello P. A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma. *J Transl Med* 2006;4:50.
76. Arnold D, Peinert S, Voigt W, Schmoll HJ. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: present and future role in gastrointestinal cancer treatment: a review. *Oncologist* 2006;11:602-11.
77. Szabad G, Kormos B, Pivarsci A, Szell M, Kis K, Kenderessy Szabo A, Dobozy A, Kemeny L, Bata-Csorgo Z. Human adult epidermal melanocytes cultured without chemical mitogens express the EGF receptor and respond to EGF. *Arch Dermatol Res* 2007;299:191-200.
78. Mirmohammadsadegh A, Hassan M, Gustrau A, Doroudi R, Schmittner N, Nambiar S, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR. Constitutive expression of epidermal growth factor receptors on normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 2005;125:392-4.
79. Kraehn GM, Schartl M, Peter RU. Human malignant melanoma. A genetic disease? *Cancer* 1995;75:1228-37.
80. Yin M, Yoshida MA, Tonomura A, Kasuga T. Cytogenetic studies of human malignant melanoma cell lines. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1992;39:43-54.
81. Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* 2005;103:1265-73.
82. Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, Yamane T, Kono K, Enomoto N, Ooi A. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 2006;118:1173-80.
83. Sauer T, Guren MG, Noren T, Dueland S. Demonstration of EGFR gene copy loss in colorectal carcinomas by fluorescence in situ hybridization (FISH): a surrogate marker for sensitivity to specific anti-EGFR therapy? *Histopathology* 2005;47:560-4.
84. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:4170-6.
85. Montero AJ, Diaz-Montero CM, Mao L, Youssef EM, Estecio M, Shen L, Issa JP. Epigenetic inactivation of EGFR by CpG island hypermethylation in cancer. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1494-501.
86. Mouawad R, Soubrane C, Rixe O, Khayat D, Spano JP. An unexpected inverse correlation between soluble epidermal growth factor receptor and interleukin-6 in metastatic malignant melanoma patients. *Melanoma Res* 2006;16:335-40.

87. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-55.
88. Koynova D, Jordanova E, Kukutsch N, van der Velden P, Toncheva D, Gruis N. Increased C-MYC copy numbers on the background of CDKN2A loss is associated with improved survival in nodular melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:117-23.
89. Casorzo L, Luzzi C, Nardacchione A, Picciotto F, Pisacane A, Risio M. Fluorescence in situ hybridization (FISH) evaluation of chromosomes 6, 7, 9 and 10 throughout human melanocytic tumorigenesis. *Melanoma Res* 2005;15:155-60.
90. Tran TP, Titus-Ernstoff L, Perry AE, Ernstoff MS, Newsham IF. Alteration of chromosome 9p21 and/or p16 in benign and dysplastic nevi suggests a role in early melanoma progression (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13:675-82.
91. Fujimoto A, Morita R, Hata N, Takehara K, Takata M. p16INK4a inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. *Oncogene* 1999;18:2527-32.
92. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003;163:1765-70.
93. Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C. Microsatellite analysis at 1p36.3 in malignant melanoma of the skin: fine mapping in search of a possible tumour suppressor gene region. *Melanoma Res* 2003;13:29-33.
94. Wagner SN, Wagner C, Briedigkeit L, Goos M. Homozygous deletion of the p16INK4a and the p15INK4b tumour suppressor genes in a subset of human sporadic cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1998;138:13-21.
95. Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:211-26.
96. Ushio Y, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Shinojima N, Kochi M, Saya H. Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p16, PTEN, and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma. *Front Biosci* 2003;8:e281-8.
97. Schulz WA. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer* 2006;119:1513-8.
98. Wentzensen N, Braumann UD, Einenkel J, Horn LC, von Knebel Doeberitz M, Loffler M, Kuska JP. Combined serial section-based 3D reconstruction of cervical carcinoma invasion using H&E/p16INK4a/CD3 alternate staining. *Cytometry A* 2007;71:327-33.
99. Gruis NA, Bergman W. [From gene to disease; from p16 to melanoma]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000;144:2100-2.
100. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, Chompret A, Ghiorzo P, Gruis N, Hansson J, Harland M, Hayward N, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:894-903.
101. Aviles JA, Lazaro P. [Genetic predisposition in cutaneous melanoma]. *Actas Dermosifiliogr* 2006;97:229-40.
102. Fargnoli MC, Argenziano G, Zalaudek I, Peris K. High- and low-penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:657-70.
103. Newton Bishop JA, Bishop DT. The genetics of susceptibility to cutaneous melanoma. *Drugs Today (Barc)* 2005;41:193-203.
104. Laud K, Marian C, Avril MF, Barrois M, Chompret A, Goldstein AM, Tucker MA, Clark PA, Peters G, Chaudru V, Demenais F, Spatz A, et al. Comprehensive analysis of CDKN2A (p16INK4A/p14ARF) and CDKN2B genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma. *J Med Genet* 2006;43:39-47.

Függelék