

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**GÉNELTÉRÉSEK BIOLÓGIAI SZEREPE ÉS
PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE HUMÁN
MALIGNUS MELANOMÁKBAN**

Vízkeleti Laura

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2013

A doktori értekezés betélapja

**GÉNELTÉRÉSEK BIOLÓGIAI SZEREPE ÉS PROGNOZTIKAI JELENTŐSÉGE
HUMÁN MALIGNUS MELANOMÁKBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az *egészségtudományok* tudományágban

Írta: **Vízkeleti Laura** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Megelőző orvostan és népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora
tagok: Dr. Török Olga, kandidátus
Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2013. december 19. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora
Dr. Dezső Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora
Dr. Török Olga, kandidátus
Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora
Dr. Dezső Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2013. december 19. 13 óra
DE OEC Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

Bevezetés

Humán malignus melanoma

A heterogén fenotípusú melanocita eredetű malignus melanomát a legagresszívabb bőr daganatok között tartják számon, mely az összes eset körülbelül 20%-ért felelős. A bőr daganatok okozta halálozások döntő többsége is az áttétes melanomáknak tulajdonítható. Kialakulásuk során a transzformált sejtek általában megtartják pigment termelő képességüket barnás léziókat eredményezve a bőrön. A melanoma progresszió morfológiailag és biológiailag eltérő fázisokra tagolható: 1.) benignus nevus: veleszületett vagy újonnan kialakult, szimmetrikus anyajegy, 2.) diszplastikus nevus: morfológiailag megváltozott, atípusos anyajegy, 3.) *in situ* melanoma: nem invazív, a daganat az epidermisz felsőbb rétegeiben lokalizálódik, 4.) radiális növekedési fázis (RGP): az epidermisz felszínén sugár irányban növekvő lézió mikroinvázióval a dermiszbe, 5.) vertikális növekedési fázis (VGP): vertikálisan, a mélyebb szövetekbe terjedő lézió, 6.) metasztatikus melanoma: helyi és/vagy távoli szervi áttéteket képző tumor.

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

Nemzetközi szervezetek ajánlásával 2002-ben került bevezetésre egy új, a prognózist befolyásoló legfőbb tényezőket is figyelembe vevő stádium besorolási rendszer, a TNM (tumor - nyirokcsomó - metasztázis). Legfőbb előnye a szentinel nyirokcsomó biopszia

bevezetése, mellyel elkerülhetővé vált a sokszor felesleges és invazív, preventív célzattal történő lokális nyirokcsomó eltávolítás.

Etiológia és a fő kockázati tényezők

A malignus melanoma multifaktoriális etiológiával jellemezhető, mely számos genetikai és környezeti tényező kölcsönhatása révén alakul ki. Az elmúlt évtizedek intenzív kutatásai számos, a malignus melanoma fejlődésében fontos szerepet játszó exo- és endogén faktorokat tártak fel. Az exogén faktorok közé tartozik a természetes és mesterséges forrásból (pl. szolárium) származó UV sugárzás és az élet során elszenvedett napégések száma. Míg az endogén faktorok között szerepel a természetes fényvédelem és DNS hibajavítási mechanizmusok meghibásodása, a fényérzékenységet okozó gyógyszerek és kozmetikumok használata, valamint a családi anamnézis vagy DNS polimorfizmusok és mutációk jelenléte. Az akut nap expozíció, különösen a gyerekkori többszöri leégés, döntő szereppel bír a legtöbb melanoma típusú daganat kialakulásában. A napsugárzásban jelenlevő környezeti karcinogén minden esetben az UV sugárzás, azon belül is a rövidhullámú UVB (280-320 nm) komponens, de az UVA (320-400 nm) melanoma genesisben betöltött kisebb mértékű szerep is bizonyított már. A betegség kialakulását és felismerését követően a prognózist leginkább a Breslow vastagság, felszíni kifeléelyesedés megléte, az infiltrált nyirokcsomók száma és az infiltráció mértéke (mikro- és makro metasztázisok) határozza meg. A beteg túlélés aránya és a terápia hatékonysága általában nők esetében a jobb.

A melanoma molekuláris háttere

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

A melanomás betegek mintegy 10%-ánál mutatható ki családi hajlam, melyben olyan csírasejtes eltérések játszanak szerepet, mint a CDKN2A gén deléciója és mutációja az esetek 10%-40%-ában a földrajzi elhelyezkedéstől függően, a CDK4-et érintő mutációk, és néhány, eddig még nem karakterizált gén eltérése az 1p22 és 20q11.22 lokuszokon. A legújabb tanulmányok már az egy nukleotidás polimorfizmusokra (SNP) fókuszálnak a melanoma

fogékonyság kapcsán, és néhány olyan gén lehetséges kockázat növelő szerepére világítanak rá, melyek a DNS hibajavítás vagy oxidatív stressz útvonalakban töltik be funkciójukat.

Számos jelátviteli útvonal kulcs szerepét bizonyították már a *de novo* melanomák progressziójában. Néhány közülük régóta ismert, mint a p16INK4a-CDK4/6-RB és p14ARF-MDM2-p53 útvonalak, melyek eltérése hozzájárul a sejt ciklus deregulációjához, másrészt a p16 meghibásodása által fokozott érzékenység alakul ki az UV indukált DNS károsodásra és oxidatív stresszre. De ide tartoznak a tirozin kináz receptor jelátvitel fő targetei a RAS/MAPK és PI3K/AKT útvonalak is, vezető szereppel bírva a melanoma genézisben, a sejt proliferációban és a sejtek túlélésében. A fent említett molekuláris kaszkádok közötti interakciók is tovább segíthetik a tumor genézist, sejtnövekedést, kemorezisztencia kialakulását, inváziót, migrációt és a sejtciklus reguláció zavarát. A klasszikus útvonalak mellett szerepet kap még a kanonikus WNT- β -katenin és MSH-PKA-MITF jelátvitel is, rendre hozzájárulva a melanoma sejtek túléléséhez/proliferációjához vagy a pigmentációhoz. További, nemrég azonosított útvonal a Notch1 szignalizáció, mely tumorszuppresszor és onkogén hatással egyaránt rendelkezik a sejt-sejt interakcióktól vagy az extracelluláris környezettől függően, és az iNOS kaszkád, hozzájárulva a reaktív oxigén és nitrogén gyökök eliminálásához.

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

A 11q13-as lokuszon található CCND1 onkogén a sejtciklus G₁/S fázis átmenet fő szabályozó molekulája. Transzkripció aktiválása elsősorban tirozin kináz receptorok közvetítésével a Ras-MAPK jelátviteli kaszkádon keresztül valósul meg. Emellett egyéb citokinek, transzkripció faktorok és extracelluláris mátrix fehérjék PI3K-Akt-mTOR kaszkád stimulációja, valamint a csökkent protein degradáció szintén hozzájárul a megnövekedett CCND1 szinthez.

Ezek alapján, az új genetikai alterációk identifikálása és szerepének azonosítása a gén expresszió szabályozásában összehangoltan az epigenetikai folyamatokkal, továbbá a malignus transzformációban és daganat progresszióban szerepet játszó jelátviteli utak azonosítása új távlatokat nyithat a daganat ellenes terápiában.

Jelenlegi és új célzott terápiák a melanoma kezelésére

A leghatékonyabb melanoma ellenes terápia a mai napig a primer tumor sebészi eltávolítása, valamint az ezt követő szentinel nyirokcsomó biopszia. A legtöbb gondot okozó áttétes daganatok esetében a Dacarbazine (DTIC) vált az elsőként elfogadott kemoterápiás szerré 15%-25%-os válaszadási aránnyal és a mindössze 5%-os komplett válasszal. A magas kockázatú melanomák esetében a DTIC mellett nagy dózisú interferont is alkalmaznak adjuváns kezelésként, melyet bizonyos esetekben sugárterápiával egészítenek ki több-kevesebb sikerrel. Az elmúlt néhány évben a US Food and Drug Administration számos korlátozással jóváhagyott 3 olyan új hatóanyagot, melyek ígéretes alapot jelenthetnek a melanoma jövőbeni kezelésére:

1. **vemurafenib (PLX4032)**, BRAF inhibitor az inoperábilis vagy metasztatikus, BRAF^{V600E} mutációt hordozó melanomáknál
2. **ipilimumab**, immunstimulátor ágens az inoperábilis vagy metasztatikus melanomáknál
3. **pegilált interferon alfa-2b**, III-as stádiumú melanomáknál

A Vemurafenib (PLX4032) egy nagy szelektivitású BRAF inhibitor, mely képes gátolni a mutáns BRAF molekulát, ugyanakkor kevés hatással van a vad típusúra. A terápia fő korlátját a viszonylag gyorsan kialakuló rezisztencia jelenti (átlag 6 hónap), emellett toxikus mellékhatásként fokozza a pikkelysejtes karcinómák (SCC) és keratoachanthomák növekedését a kezelt beteg kb. 20%-ában. Az ipilimumab egy immunostimuláns antitest a citotoxikus T-sejtek negatív kostimulátor antigén-4 (CTLA4) molekulája ellen, melyet komplex kezelésekben és monoterápiaként egyaránt alkalmazni próbálnak számos daganat esetében. Azonban a válaszadási arány és a teljes túlélésben elért növekedés mérsékelt, és sok a mellékhatás, mint az immunrendszerrel összefüggő enterokolitisz, hepatitisz vagy dermatitisz. Emellett, számos egyéb célzott terápia is klinikai kipróbálás fázisában jár (pl. imatinib, lapatinib, anti-VEGF kezelés vagy immunterápiák tovább fejlesztése) monoterápiaként vagy komplex kezelések részeként. A nagyfokú fejlődés ellenére a terápiás lehetőségek még mindig korlátozottak, sürgetve új hatásmechanizmusú szerek felfedezését.

Célkitűzések

A kután melanomák citogenetikai heterogenitása és agresszív metasztatikus viselkedése komoly problémákat okoz nem csak a szövettanilag nehezen diagnosztizálható melanomák klasszifikációjában vagy a melanomák egyéb lézióktól, főként Spitz, kék vagy proliferáló kongenitális nevusoktól való megkülönböztetésében, hanem a daganat prognosztizációban és a hatékony kezelésben is. A tumor genesis és progresszió háttérben álló molekuláris eltérések mélyebb megértése és az ismert molekuláris targetek evaluálása döntő szereppel bírhat olyan egyedi biológiai tulajdonságokkal rendelkező melanoma betegcsoportok azonosításában, akik kedvezőbben reagálhatnak adott célzott targetekkel szembeni terápiákra. Ezért munkánkban olyan génteráziók identifikálására fókuszáltunk, melyek a különböző melanomák eltérő biológiai viselkedésével társultak, és lehetséges diagnosztikai és prognosztikai jelentőséggel bírhatnak.

A tanulmány specifikus céljai az alábbiak voltak:

A 7q31-es régió vizsgálata:

1. A 7q31-es lokusz genetikai eltéréseinek vizsgálata interfázisos FISH technikával primer melanoma szöveti mintákban és az ezekből kialakuló nyirokcsomó áttétekben, valamint különböző biológiai viselkedésű melanoma sejtvonalakban. A FISH eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel.
2. A 7q31-en lokalizálódó CAV1 és TES mRNS és fehérje szint változásainak meghatározása primer melanomákban és sejtvonalakban qRT-PCR és szöveti microarrayken végzett immunhisztokémia alkalmazásával. Az expressziós eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel.
3. A 7q31 alterációk és génexpressziós változások közötti kapcsolat vizsgálata.

A CCND1 gén vizsgálata:

1. A CCND1 onkogén genetikai eltéréseinek vizsgálata interfázisos FISH technikával. A FISH eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel, valamint a BRAF és NRAS mutációs státusszal.
2. A CCND1 mRNS és fehérje expressziós változások meghatározása primer melanomákban qRT-PCR és szöveti microarrayken végzett immunhisztokémia alkalmazásával. Az expressziós eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel, valamint a BRAF és NRAS gének expressziós és mutációs státuszával.

Anyagok és módszerek

Melanoma szöveti minták

Valamennyi melanoma szövet a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájáról származott. A vizsgálatban szereplő betegek nem kaptak kezelést a primer tumorok sebészeti eltávolítását megelőzően. A disszertációban ismertetett kutatás a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottságának jóváhagyásával történt a vonatkozó szabályozások figyelembevételével. A betegek aláírták a kutatásba beleegyező nyilatkozatot. A tumorok diagnosztizálása formalin fixált paraffinba ágyazott (FFPE) szöveti metszetek hematoxilín-eozin festését követően történt a Bőrgyógyászati Klinikán. A klasszifikációhoz a TNM besorolási rendszer legújabb verzióját alkalmaztuk. Mivel a 7q31 és CCND1 kísérletek nem egy időben történtek, így a vizsgált melanoma minták nem voltak komplett átfedésben.

Melanoma sejtvonalak és sejtenyésztés

A kísérletekben az alábbi melanoma sejtvonalakat alkalmaztuk:

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

Az összes sejtvonal RPMI 1640 médiumban volt fenntartva, mely FBS-sel, L-glutaminnal és antibiotikummal volt kiegészítve. Az egyrétegben növesztett adherens sejteket tripszin/EDTA oldattal kezeltük és PBS-sel (pH 7.2) mostuk kétszer. A sejt pelletet ezt követően KCl-dal kezeltük (hipotóniás kezelés), tárgylemezre cseppentettük és Carnoy fixálóval fixáltuk. A lemezeket felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az összes vegyszert a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). A WM35, WM983A és WM983B

sejtvonalak a Coriell Cell Repositoriesből (Coriell Institutes, Camden, NJ, USA) származnak. Az A2058 sejtvonalat az American Type Culture Collectiontól (LGC Standards GmbH, Wesel, Németország) szereztük be, míg a HT168, HT168M1 és HT199 sejtvonalakat a budapesti Magyar Onkológia Intézettől ajándékba kaptuk.

Array komparatív genom hibridizáció

Az array CGH kísérletek HumanArray 3.1 arrayken végezték (University of California, San Francisco Cancer Center array Core, USA). A jelölt DNS-eket Cot-1 DNS-sel keverték. Az arrayk hibridizációja, szkennelése és analízise a szolgáltató labor protokollja szerint történt.

Kromoszómapreparálás normál limfocitákból

A normál limfociták kromoszóm preparátumát egészséges donorokból származó vérből EuroClone Chromosome kit „P” (EuroClone S.p.A., Milano, Olaszország) segítségével végeztük a gyártó által meghatározott protokoll szerint. A citoplazma mentes szuszpenziót ezt követően nedves tárgylemezekre cseppentettük, majd a lemezeket szárítottuk és -20°C-on tároltuk.

DNS specifikus próbák

A FISH vizsgálatokhoz alkalmazott DNS specifikus próbák az alábbiak voltak:

- 7-es kromoszóma centroméra-specifikus / 7q31 lokusz specifikus DNS próbák
- 7-es kromoszóma centroméra-specifikus / CCND1 gén specifikus DNS próbák

A DNS specifikus próbákat a Vysis, Inc. (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) cégtől szereztük be. A centroméra-specifikus próbák Spectrum Green konjugált dUTP-vel (zöld fluoreszcencia), míg a lokusz és gén specifikus próbák Spectrum Orange konjugált dUTP-vel (piros fluoreszcencia) voltak jelölve. A sejtmagokat antifade oldatban oldott diaminofenilindollal (DAPI, kék fluoreszcencia) festettük (Vectashield, Vector Laboratories LTD, Peterborough, UK). A DNS specifikus próbák megbízhatóságát egészséges emberből származó normál limfociták kromoszóma preparátumán teszteltük.

Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

A vizsgálatokat friss-fagyasztott tumorokból készített lenyomat preparátumokon hajtottuk végre. A tárgylemezeket előzetesen 3-aminopropyltrimethoxy-silane-nal kezeltük (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) a gyártó protokollja alapján. A próbás mixet és target sejteket egyidejűleg denaturáltuk és hibridizációs kamrában hibridizáltuk (HYBrite). Az

aspecifikusan vagy nem kötődött DNS próbákat mosó pufferrel távolítottuk el. A száradást követően a sejtmagokat antifadeben oldott DAPI festékekkel festettük. A kiértékelést fluoreszcens mikroszkóppal végeztük (ZEISS Axioplan, Carl Zeiss, Jena, Németország) mintánként 100-200 sejtet számolva. A háromszínű képeket digitális képanalizáló rendszerrel készítettük (ISIS Metasystem GmbH, Altlussheim, Németország). A 7q31 és CCND1 kópiaszám kategóriák az alábbiak szerint kerültek meghatározásra:

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

A kópiaszám indexet (CNI) az alábbi szerint határoztuk meg: fluoreszcens jelek össz száma / mintánként számolt sejtek száma. A CCND1 vizsgálatoknál alkalmazott statisztikai interakció és logisztikus regressziós analízisekhez az alábbi kópiaszám csoportokat alkottuk meg a kalkulált CNI értékek alapján: nem CCND1 amplifikált ($CNI \leq 2.5$) és CCND1 amplifikált ($CNI > 2.5$). Az optimális „cutoff” értéket ROC görbe analízissel határoztuk meg.

RNS extrakció és valós idejű qRT-PCR

A totál RNS izolálást RNeasy Mini kit segítségével végeztük (Qiagen GmbH, Hilden, Németország), és a mintákat NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel kvantifikáltuk (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). TaqMan egy lépéses RT-PCR-t alkalmaztunk a CAV1, TES, BRAF, NRAS és CCND1 mRNS szintek meghatározására reakciónként 3 ismétléssel ABI-PRISM 7000 készüléken (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). A reverz-transzkriptázt, Master Mixet és assayket a Life Technologiéstól szereztük be. Az adatelemzést Livak módszerrel végeztük, a belső kontroll GAPDH, a kalibrátor minta 3 különböző személytől származó nevus minta illetve tenyésztett melanocita volt.

Szöveti microarrayk és immunfestés

Az eredeti blokkokból származó szöveti metszeteken hematoxili-eozin festést követően patológusok segítségével behatároltuk a tumorsejt dús területeket, és ahol lehetett, mintánként három 1 mm átmérőjű blokkot vágunk ki automatikusan TMA Master (Carl Zeiss, Jena, Németország) segítségével. Az így elkészült TMA blokkokból készített metszeteken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk hematoxili-eozin festéssel történt validációt követően. A paraffin eltávolítását, az endogén peroxidázok és nem specifikus kötőhelyek blokkolását követően az antigéneket forrásban levő citrát pufferrel tártuk fel (pH 6). A HMB45, CAV1 és TES elleni elsődleges antitesteket a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) cégtől, míg a CCND1 elleni antitestet a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) cégtől szereztük be. A primer antitestekkel történt inkubációt követően a fehérje expressziót Envision/HRP detekciós rendszerrel (DAKO Inc., Glostrup, Dánia) és VIP peroxidáz szubsztrát kittel (Vector Laboratories LTD, Peterborough, UK) vizualizáltuk. A sejtmagokat metilzölddel festettük (Vector Laboratories LTD, Peterborough, UK). Negatív kontrollokként kihagytuk a primer antitestet. A pozitív kontrollok az alábbiak voltak: A541 humán tüdődaganat eredetű sejtvonal és endoteliális sejtek CAV1 esetében, Jurkat sejtek TES esetében és MCF7 humán emlődaganat eredetű sejtvonal CCND1 esetében. A festett lemezeket MiraxScan szkennelvel digitalizáltuk (Carl Zeiss, Jena, Németország). Az így kapott képeket MiraxViewer szoftver segítségével jelenítettük meg (Carl Zeiss, Jena, Németország), majd a kiértékelést 2, a minták klinikai-patológiai adataira vak dermatopatológus végezte. A reakció pozitivitást 4 fokozatú skálán értékeltük: 0, nincs festődés; 1+, határozott, de enyhe festődés; 2+, közepes mértékű festődés; és 3+, erős festődés. A mintánkénti triplikátumok egyedi eredményeit egyetlen értékévé összesítettük. A CCND1 esetében a kiértékelést quickscore módszerrel is elvégeztük, mely figyelembe veszi mind a festődés mértékét, mind pedig a pozitív sejtek százalékos arányát, és ez alapján a mintákat 0-tól 2-ig terjedő csoportokba kategorizáltuk. Az additív quickscore módszerrel az alábbi csoportokat definiáltuk: 0, 1-3 pont; 1, 4-6 pont; és 2, 7-9 pont. A multiplikatív quickscore módszerrel pedig az alábbi csoportokat alkottuk meg: 0, 0-6 pont; 1, 7-12 pont; és 3, 13-18 pont. Az additív quickscore az „A” kategória (festődést mutató sejtek százalékos aránya) és „B” kategória (festődés intenzitása) összege, míg a multiplikatív quickscore az „A” és „B” kategóriák szorzata adja meg. Mivel a különböző quickscore metodikák eredményei erős pozitív korrelációt mutattak ($R=0.996$, $p<0.0001$, Spearman korreláció), ezért a multiplikatív megközelítést alkalmaztuk a későbbi analízisekben, mivel az additív

megközelítés elfedte a fehérjére negatív eredményeket, amit az esetek 13%-ában (7/54) megfigyeltünk, és a pontozási skála is szűkebbnek bizonyult.

Fehérje extrakció melanoma sejtvonalakból és western blot analízis

Három, eltérő biológiai viselkedésű melanoma sejtvonal (WM35, HT199 és WM983B) vett részt a western blot vizsgálatokban. A sejteket proteáz és foszfatáz inhibitorokat tartalmazó RIPA pufferben szüreteltük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A totál protein koncentrációkat Bradford assayvel határoztuk meg (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország). Az izolált fehérjét felhasználásig -80°C -on tároltuk. A denaturált és redukált (2- β -mercaptoethanol) mintákat előregyártott 5-14% gradiens SDS-polyacrylamide géleken szeparáltuk, félszáraz transzferrel polyvinylidene difluoride (PVDF) membránra vittük át (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Hungary) és specifikus primer antitestekkel inkubáltuk. A GAPDH (loading kontroll), CAV1 és TES elleni elsődleges antitesteket a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), míg a CCND1 elleni antitestet a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) cégektől szereztük be. A jel detektálására peroxidáz-konjugált másodlagos antitesteket alkalmaztunk, és kemilumineszcenciával tettük láthatóvá (ECL, GE Healthcare, IL, USA). A kész immunblotokat GS-800 Kalibrált Denzitométerrel kvantifikáltuk (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország), és az egyes fehérje szinteket összehasonlítottuk.

A BRAF és NRAS gének mutációs analízise

A genomi DNS izolálást a G-Spin Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Kyunggi, Kórea) segítségével végeztük friss/fagyasztott szöveti mintákból, és a mintákat NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel kvantifikáltuk. A DNS minták minőségét 1.2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A BRAF^{V600} és NRAS^{Q61} kodonokban előforduló mutációkat LightCycler rendszeren (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) olvadáspont analízissel detektáltuk fluoreszcens próbákat alkalmazva (TIB Molbiol, Berlin, Németország). A szenzor próba fluoreszcenciával, míg az anchor próba LCRed640 festékkel volt konjugálva. Az így nyert eredményeket a PCR termékek direkt szekvenálásával erősítettük meg (BIOMI Kft, Gödöllő, Magyarország).

Statisztikai analízis

Az eredmények kiértékelését SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) és R-2.15.0 program csomagok segítségével végeztük. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel, a variancák

egyenlőségét pedig Leven teszttel határoztuk meg. Mivel adataink nem normál eloszlást mutattak, ezért nem parametrikus tesztek alkalmaztunk. Ahol szükséges volt, az adatokat reciprok (CNI) vagy \log_2 (mRNS szint) transzformálással normalizáltuk. Receiver operating characteristic (ROC) görbe analízissel határoztuk meg a túlélési analízisnél az optimális CCND1 CNI cutoff értéket. A modell magában foglalta az ismert melanoma prognosztikai faktorokat is, mint az ulceráció és az áttétképzés. A 7q31 és CCND1 kópiaszámok és a vonatkozó kromoszóm kópiaszámok (rendre 7 és 11), valamint a primer daganatok klinikai-patológiai paraméterei közötti összefüggések feltárására Fisher egzakt, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney-Wilcoxon tesztek, és logisztikus regressziót alkalmaztunk. Statisztikai interakciót (egyváltozós varianciánálízis) szintén vizsgáltunk annak kiderítésére, hogy a BRAF vagy NRAS mutációs státusz módosítja-e a CCND1 génelterációk hatását a vizsgált kimeneti paraméterekre. A CAV1, TES vagy CCND1 génexpresszió és a primer daganatok klinikai-patológiai paraméterei közötti összefüggéseket Kruskal-Wallis és Mann-Whitney-Wilcoxon tesztekkel határoztuk meg. A CCND1, BRAF és NRAS mRNS szintek közötti korreláció kimutatására Pearson korrelációt alkalmaztunk. Az additív és multiplikatív quickscore kiértékelési módszerek korrelációjához Spearman tesztet használtunk. A túlélési analízist Kaplan-Meier, Log Rank és Cox regressziós tesztekkel végeztük. A 0.05-nél kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az irodalommal összhangban, a több mint kétszeres expresszió szintbeli változást alul- vagy felülexpresszióként definiáltuk.

Eredmények

A 7q31-es régió elhelyezkedő CAV1 és TES gének, mint a humán melanomák lehetséges prognosztikai markerei

7q31 alterációk és primer tumorok klinikai-patológiai paramétereinek közötti összefüggések

Összesen 75 primer melanoma vett részt a FISH analízisben. A kalkulált 7q31 lokusz CN1 korrelált a 7-es kromoszóma kópiaszám eltéréseivel ($p < 0.001$), és szignifikánsan magasabb volt azon primer daganatokban, melyeket metasztatizáló hajlam ($p = 0.012$) és kifekélyesedő felszín ($p = 0.002$) jellemzett. Továbbá, az 50 évnél idősebb betegek szintén magasabb 7q31 kópiaszámmal voltak jellemezhetőek a fiatalabb korcsoportokhoz viszonyítva ($p = 0.038$).

CAV1 és TES mRNS és protein expresszió primer melanomákban

Összesen 33 primer melanoma esetében volt lehetőség a CAV1 és TES mRNS expresszió vizsgálatára. A CAV1 mRNS szint szignifikánsan magasabb volt vastag daganatokban ($p = 0.002$), míg a TES mRNS szintek eltérést mutattak a különböző helyen lokalizálódó áttétekkel rendelkező primer tumorokban ($p = 0.011$).

Összesen 60 primer melanoma CAV1 és TES fehérje expressziós vizsgálatát végeztük el szöveti microarray segítségével. A vizsgált nevus minták egyik fehérje esetében sem mutattak erős pozitívítást. A melanoma szövetek általánosságban erős CAV1 membránfestődés mellett, gyenge és diffúz citoplazma festődést is mutattak. Míg a TES fehérje gyakran képzett plakkokat a membránban, azonban, egy gyenge plazma pozitívítás is megfigyelhető volt. A CAV1 fehérje a primer melanomák 83%-ában (41/51) volt detektálható. A fennmaradó 10 minta negatív volt a CAV1 festődésre. A vizsgált paraméterek közül a Breslow vastagság mutatott egyedül összefüggést a CAV1 fehérje szintekkel ($p = 0.038$). A vastag melanomák ugyanis csökkent expresszióval voltak jellemezhetőek; azonban fontos megjegyezni, hogy a vékony léziók egy alcsoportja szintén nem mutatott fehérje festődést. A TES fehérjét a primer tumorok 76%-a (42/55) expresszálta. Azonban egyetlen vizsgált klinikai-patológiai paraméterrel sem találtunk szignifikáns összefüggést.

A 7q31 genetikai eltérések, CAV1 és TES mRNS valamint fehérje expressziós változások közötti korreláció vizsgálata primer melanomákban és melanoma sejtvonalakban

Összesen 14 primer melanoma esetében volt lehetőségünk mind a 7q31 kópiaszám alterációk, mind pedig a CAV1 és TES expressziós szintek közötti kapcsolat elemzésére. Az eredmények

világosan mutatják, hogy a lokusz amplifikációja nem vagy gyenge korrelációban áll az itt lokalizálódó CAV1 és TES gének mRNS és fehérje szintjeivel.

Hét, eltérő biológiai viselkedésű melanoma sejtvonal (WM35, WM983A, WM983B, HT199, A2058, HT168 és HT168M1) esetében is meghatároztuk a 7q31-es lokusz kópiaszám eltéréseit, valamint a CAV1 és TES gének mRNS és fehérje expressziós szintjét. A lokusz kismértékű amplifikációja és deléciója minden vizsgált sejtvonalban kimutatható volt különböző frekvenciával. A régió vesztését 3 sejtvonalban (WM983B, HT199 és WM35) figyeltük meg gyakran, a WM983A és HT168 kismértékű amplifikációval volt jellemezhető, míg az A2058 és HT168M1 sejtvonalak esetében a 7q31 nagymértékű amplifikációja volt a legkarakterisztikusabb kópiaszám kategória. A CAV1 relatív mRNS expressziója hasonló mintázatot mutatott a legtöbb sejtvonalban (WM35, WM983A, WM983B, HT199 és HT168). Jelentős asszociációt figyeltünk meg a 7q31 nagymértékű amplifikáció és a CAV1 mRNS szint között 2, agresszív fenotípusú sejtvonalban (A2058 és HT168M1). A fehérje expressziót tekintve, eltérő mértékben, de valamennyi vizsgált sejtvonal expresszálta a CAV1 molekulát. Magas fehérje szintet tudtunk kimutatni az invazív, de nem metasztatikus WM35-ben, valamint az áttétképző hajlammal rendelkező WM983B, HT199, A2058 és HT168 sejtvonalakban, míg a WM983A CAV1 fehérje szintje alacsony volt. Ezzel szemben a HT168M1 nem mutatott semmiféle protein pozitivitást. A TES mRNS expresszió minden sejtvonalban nagyfokú növekedést mutatott a kontroll melanocitákhoz viszonyítva, mely fokozódás a fehérje szint emelkedését vonta maga után. A WM35, HT199 és WM983B sejtvonalak esetében az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit western blottal is megerősítettük.

CCND1, a humán kután melanomák lehetséges prognosztikai markere

CCND1 kópiaszám alterációk primer melanomákban és az eltérések összefüggése a BRAF és NRAS mutációkkal

Összesen 76 primer melanoma FISH analízisét végeztük el. A kalkulált CCND1 CNI jól korrelált a 11-es kromoszóma kópiaszámával ($p=0.008$), és szignifikánsan alacsonyabb volt a végtagokon kialakuló ($p=0.043$) és nem ulcerált ($p=0.048$) melanomákban. Míg magasabb kópiaszám jellemezte a távoli szervi illetve többszörös áttétet képző primer daganatokat ($p=0.029$).

A logisztikus regressziós analízis szintén gyakori CCND1 amplifikációt mutatott ki ulcerált felszínű [esély hányados (EH) =2.934; 95% konfidencia intervallum (KI) =1.155–

7.454; $p=0.024$] és többszörös áttétképző (EH=11.538; 95% KI=1.297–102.654; $p=0.028$) tumorokban. A kedvezőtlen klinikai kimenetel ismert prediktoraira, mint az ulceráció, Breslow vastagság és metsztatizáló hajlam való korrekciót követően a CCND1 amplifikált melanomák (CNI>2.5, a ROC görbe analízis alapján) mintegy 1.6-szor nagyobb eséllyel okozták az egyén betegség specifikus halálát, habár ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0.278$), valószínűleg a viszonylag kevés adatnak köszönhetően.

A vizsgált 55 primer melanomából 24 (44%) hordozott mutációt a BRAF 600-as kodonjában. Ezek közül 21 (88%) lézióban V600E, 2 (8%) tumorban V600K és 1 (4%) melanomában V600R mutációt tudtunk kimutatni. Míg az NRAS 61-es kodon mutációi összesen 8 (15%) primer melanomában fordultak elő az alábbi típusokban: 5 (63%) Q61K, 2 (25%) Q61R és 1 (2%) Q61L mutációt hordozó lézió. A BRAF és NRAS mutációk egyetlen vizsgált mintában sem fordultak elő együttesen. A mutációt hordozó minták viszonylag alacsony száma és ugyanazon útvonalra gyakorolt azonos hatása miatt a különböző BRAF^{V600} és NRAS^{Q61} mutációkat együtt kezeltük az analízis során.

A CCND1 kópiaszám eltérések és BRAF/NRAS mutációk közötti interakciós vizsgálatok nem mutattak ki semmilyen módosító hatást a CCND1 eltéréseknek a primer melanomák klinikai-patológiai paramétereivel való összefüggéseiben. Viszont korrigálva a BRAF és NRAS mutációkra, a CCND1 amplifikáció továbbra is összefüggésben állt a felszíni kifeléyesedéssel (EH=3.185; 95% KI=1.025–9.896; $p=0.045$) és a többszörös áttétképzéssel (EH=7.817; 95% KI=0.753–81.175; $p=0.085$). Azonban az utóbbi asszociáció nem bizonyult szignifikánsnak, feltehetőleg a széles konfidencia intervallum vagy a viszonylag alacsony mintaszám miatt. Továbbá, a CCND1 amplifikációval rendelkező, de BRAF vagy NRAS mutációt nem hordozó primer melanomák 4.4-szer gyakrabban alakultak ki krónikus napsugárzásnak kitett bőrfelületeken (95% KI=1.195–16.491, $p=0.026$).

CCND1 mRNS expresszió primer melanomákban

Összesen 28 primer melanoma esetében volt lehetőség a CCND1 mRNS expresszió vizsgálatára. Több mint 2-szeres expresszióbeli csökkenést az esetek 39%-ában (11/28), míg mRNS szintnövekedést a vizsgált melanomák csupán 18%-ában (5/28) mutattunk ki. A génkifejeződés és a klinikai-patológiai paraméterek közötti összefüggések analízise rávilágított arra, hogy a CCND1 mRNS expressziós mintázata primer melanomákban befolyásolhatja az áttétképzés helyét ($p=0.013$). Többszörös áttétképző minták (33%) ugyanis csökkent CCND1 mRNS szinttel jellemezhetők, míg a csak kután és/vagy nyirokcsomó

metasztázis képző léziókban (40%) fokozott CCND1 expresszió figyelhető meg. Végül, a távoli szervi (tüdő, agy, csont vagy máj) áttéteket képző primer daganatok (27%) nem mutattak eltérést a CCND1 mRNS szintben a kontroll nevus mintákhoz képest.

A CCND1 expressziós változások közepes mértékű pozitív korrelációt mutattak a BRAF (B=0.553, p=0.002) és NRAS (B=0.678, p<0.001) mRNS szintekkel. Ugyanakkor a BRAF expresszió erős pozitív korrelációban állt az NRAS mRNS szintjével (B=0.832, p<0.001). A CCND1 mRNS szint mértéke szignifikánsan összefüggött a BRAF és NRAS gének mutációs státuszával is (p=0.009, kétoldali egzakt Mann–Whitney–Wilcoxon teszt). A fenti mutációkat nem hordozó primer melanomák ugyanis megközelítőleg 2.3-szer nagyobb CCND1 expressziós szinttel rendelkeztek a mutációt hordozó mintákhoz viszonyítva.

CCND1 fehérje expresszió primer melanomákban és melanoma sejtvonalakban

Összesen 54 primer melanomában vizsgáltuk a CCND1 fehérje kifejeződését. A melanomák erős magi festődést és néhány esetben gyenge plazmapozitivitást is mutattak a fehérjére. A kiértékelés során csak a magi festődést tekintettük specifikusnak, így a melanoma minták 87%-a bizonyult pozitívnak. A nagy intratumorális heterogenitás nem jellemezte a vizsgált mintákat. A CCND1 fehérje kifejeződés mértéke szignifikánsan összefüggött a Breslow vastagsággal, áttétképzéssel és a betegek túlélésével (rendre p=0.047, p=0.028 és p<0.001). A nagyméretű, metastázis képző és a beteg halálát okozó primer tumorokat erősebb CCND1 festődés jellemezte. Azonban a pozitív sejtek számát is figyelembe véve, a tumor vastagsággal való összefüggés eltűnt. A CCND1 fehérje kifejeződésre nem volt szignifikáns hatással sem az mRNS szint, sem pedig az átlagos gén kópiaszám.

Három, eltérő biológiai viselkedésű humán melanoma sejtvonal (HT199, WM35 és WM983B) esetében is meghatároztuk a CCND1 fehérje szinteket immunhisztokémia és western blot technikák segítségével. Erős CCND1 expresszió karakterizálta az agresszív tulajdonságú HT199-et. Ezzel szemben az invazív, nude egérben nem tumorképző WM35 sejtvonal viszonylag alacsony CCND1 fehérje expresszióval volt jellemezhető, de a legkevesebb CCND1 proteint a melanoma áttétekből származtatott WM983B expresszálta. A western blot analízis eredményei megerősítették az immunhisztokémiai eredményeket.

Megbeszélés

Habár az elmúlt évtizedekben a melanoma incidencia folyamatosan nőtt, a klinikai diagnózis pontossága továbbra is limitált, és a mai napig a sebészi eltávolítás, az azt követő szetinel nyirokcsomó vizsgálattal a leghatékonyabb terápia. Emellett további probléma az egyre fiatalabb korosztályok jelentős érintettsége is. Éppen ezért a primer lézió korai felismerése és mielőbbi sebészi eltávolítása jelenleg az egyedüli esély a betegségből való tartós felépülésre. A melanomás betegek túlélési esélye ugyanis drasztikusan csökken az áttétek megjelenésével. A távoli szervi áttétek kialakulása 10% alá csökkenti az 5 éves túlélést. Jól ismert, hogy a kután melanoma, hasonlóan más lágyrész daganatokhoz genetikai betegség, melynek kialakulásának hátterében számos, a daganat fejlődés és progresszió során létrejövő genetikai eltérés felhalmozódása áll. Ezek az eltérések molekuláris szinten befolyásolják a genom integritást szabályozó folyamatokat, mely következményesen onkogének aktiválódását illetve tumorszuppresszor gének inaktiválódását eredményezi. Ezért a daganat progresszió mögött megbúvó molekuláris alterációk megértése jelentősen hozzájárulhat a klasszifikáció fejlődéséhez, különösen a szövettanilag kétes minták esetében, továbbá elősegítheti a pontosabb diagnózis felállítását vagy hatékony terápiai targeteket szolgáltat a jövőben.

A 7q31-es lokusz eltéréseinek kapcsolata a melanoma progresszióval

Jelen disszertáció egyik célja volt a 7q31-es régió kópiaszám eltéréseinek meghatározása viszonylag nagyszámú mintán, primer melanomákban, FISH technika segítségével. Továbbá az így kapott genetikai eredmények és a klinikai-patológiai paraméterek korrelációs analízise. A tanulmány egyik erőssége, hogy a kópiaszám alterációk mellett az itt lokalizálódó FRA7G fragilis pont körüli gének (CAV1 és TES) mRNS és fehérj expressziós vizsgálatát is elvégeztük, rávilágítva melanoma progresszióban betöltött lehetséges szerepükre. „Common fragile site”-ok (CFS) valamennyi egyén genomjában megtalálható, nem random módon elhelyezkedő, nagyméretű (megabázis vagy nagyobb) DNS régiók, melyek a DNS szintézis részleges megakadása során helyspecifikus törések targetjei a metafázisos kromoszómákon. A normál kromoszóma struktúra részeként szomatikus sejtekben általában stabilitás jellemzi őket. Azonban tumorsejtekben a CFS-ok és a hozzájuk asszociálódó gének igen gyakran deléción, átrendeződés vagy amplifikáció elszenvedői, utalva a daganatok genom instabilitásában betöltött fontos szerepükre. Genetikai instabilitásuk speciális szerkezetüknek köszönhető: ezek a szekvenciák ugyanis G-sáv karakterűek egy R-sáv struktúrájú DNS szakaszon belül. Így a CFS-ok és a szomszédos régiók közötti szerkezeti különbségek

hatással lehetnek a DNS replikáció és kromatin kondenzáció szabályozására, hozzájárulva törékenységükhöz. Ugyanakkor megfigyelhető néhány szembetűnő hasonlóság a különböző CFS-ok között, mint a nagy méret vagy hasonló gén expressziós profil, mely azt sugallja, hogy e régiók és az itt lokalizálódó gének fontos szerepet játszhatnak a sejtek környezeti és kognitív stresszre adott normál válaszaiban is.

A FRA7G egy gyakori aphidicolin-indukált fragilis hely a 7q31.2 kromoszómális lokuszon, mely a negyedik leggyakrabban expresszált a FRA3B (FHIT), FRA16D (WWOX) és FRA6E után. Az 544kb méretű régió számos gént foglal magában, mint a vírus integrációk egyik célpontja, a TES, és a lágyszöveti tumorokban gyakran amplifikált CAV1. Hasonlóan másokhoz, munkacsoportunk is kimutatta daganat sejtekben a 7q31-ter delécióját és amplifikációját egyaránt nagyfelbontású technikák segítségével, mely az itt zajló folyamatok komplex és egyedi mintázatára világít rá. A lokusz vesztese feltehetően nem a teljes szakasz vesztesét jelenti, hanem a régió belül különálló homozigóta deléciók vagy transzlokációk eredménye. Míg a FRA7G asszociált gének amplifikációja a „breakage-fusion-bridge” mechanizmus révén az előrehaladott stádiumú daganatok alapvető tulajdonsága, és mind prognosztikai, mind pedig terápiás jelentőséggel bír. Az intrakromoszómális amplikonok akkumulációja tehető felelőssé többek között a daganatok gyógyszer rezisztenciájáért. Feltételezéseink szerint az instabilitás okozta FRA7G alterációk, melyek megzavarják a régióhoz asszociálódó gének normál működését is, hozzájárulhatnak a melanómák progressziójához hasonlóan a más daganatokban megfigyelt FHIT és WWOX tumorszupresszor gén eltérésekhez, melyeket különböző genetikai és epigenetikai (promóter hipermetiláció vagy hiszton hipoacetiláció) folyamatok eredményeznek.

FISH technika segítségével a 7q31-es régió delécióját és különböző mértékű amplifikációját is sikerült kimutatnunk. A lokusz deléciója kedvezőbb klinikai kimenetellel társult, szemben az amplifikációval, mely kapcsolatban állt a primer daganatok áttétképzési hajlamával. A fokozott CAV1 fehérje expresszió szignifikáns kapcsolatban állt a tumor vastagsággal. A TES expressziós változások hatása azonban további vizsgálatokat igényel.

Korábbi tanulmányok a CAV1 multifunkcionális vázfehérje vitatott szerepét mutatták ki számos humán daganat fejlődésében. Saját vizsgálatunkban a CAV1 mRNS expresszió fokozódása a fehérje szint emelkedését vonta maga után, mely főként a daganat vastagsággal mutatott összefüggést. Másrészt a CAV1 fehérje szint csökkenését is megfigyeltük a vékony tumorok egy alcsoportjában és a kedvezőtlen klinikai kimenetelű primer mintákból származtatott sejtvonalakban, mely a CAV1 molekula lehetséges kettős szerepére utal a

melanoma progresszióban. Továbbá a CAV1 fehérje teljes hiánya az agresszív HT168M1 sejtvonalban a magas CNI és mRNS szint ellenére felveti a különböző epigenetikai folyamatok részletesebb feltérképezésének igényét is. Ezek fontos megfigyelések, mivel a CAV1 fehérjét a melanoma prognózis potenciális biomarkerének tekintik a szöveti invázióban és metasztázis képzésben betöltött feltételezett szerepe miatt. A csökkent CAV1 expresszió a tumor sejtek fokozott proliferációs képességével vagy a kaszpáz-3 út vonal sérülése révén az apoptózissal szembeni rezisztenciával társulhat, mely utóbbi végül áttétek kialakulásához vezet. Azonban a fehérje teljes elvesztése a daganatos szövet csökkent neovaszkularizációját és a tumor szupresszióját is eredményezheti a citokin receptor közvetítette jelátvitel gátlása vagy a fokális adhézións domén szerkezet regulációja/stabilizálása által csökkent tumor sejt motilitás révén. Így a CAV1 molekula daganat sejtekre gyakorolt dózisfüggő hatása is elképzelhető. Mivel a CAV1 számos interakciós partnerrel rendelkezik, ezért a partner molekulák alterációi szintén jelentős hatással lehetnek a CAV1 melanoma progresszióban betöltött szerepére, hasonlóan a Galectin-3 fehérjéhez, mely képes felülni a CAV1 tumor szupresszor hatását pajzsmirigy daganatokban. A Gal-3 a CAV1 molekulával együttesen elősegíti a fokális adhézións megbomlását, így a tumor sejtek migrációját és invázióját eredményezi. Végül, egy nemrég megjelent tanulmány rámutat a két caveolin 1 variáns, a vad típusú hosszabb láncú CAV1 α és a csonka CAV1 β forma eltérő funkciójára is. Ez utóbbi N-terminális végéről ugyanis hiányzik egy Tyr-14 régió, mely a vad típusban foszforilációt követően elősegíti a mitokondriális apoptózist, így következményesen növeli az emlő daganat sejtek paclitaxel érzékenységét. Ezért a tumor sejtek CAV1 összetétele fontos szerepet játszhat a terápiás szerekkel szembeni rezisztenciában.

Az általunk vizsgált primer melanoma tumorokban megfigyelt TES mRNS és fehérje expresszió csökkenését már korábban kimutatták fej-nyaki pikkelysejtes karcinómákban, gyomor karcinómákban és emlő daganatokban is. Habár a TES molekula eltérései általánosságban nem mutattak szignifikáns összefüggést a primer léziók metasztatizáló hajlamával, az mRNS szint változott annak függvényében, hogy a primer tumor hova adott áttétet. Ez a megfigyelés erősíti azt a hipotézist, hogy a TES hatással lehet a melanoma progresszióra az invázió befolyásolása révén. Azonban további, melanoma metasztázisok vizsgálatát is magában foglaló tanulmányokat igényel ennek kiderítése.

A 7q31-es lokusz eltérései a CAV1 és TES expressziós szint változását vonták maguk után bizonyos esetekben, ez azonban nem bizonyult szignifikánsnak. Ennek egyik oka a viszonylag kevés elérhető átfedő minta. További ok, hogy a vizsgált tumorokban csak

heterozigóta 7q31 vesztést tapasztaltunk, így a fennmaradó gén kópia még elegendő lehet a zavartalan mRNS szintézishez. Az is előfordulhat, hogy az amplifikáció nem a teljes lokuszt érinti, így az eltérés nem feltétlen fed le gént, és az érintett szakaszok méretét is nehéz meghatározni. Végül az epigenetikai szabályozásban bekövetkezett hiba szintén befolyásolja a régióról átíródó gének mRNS és fehérje szintjét.

Összegezve az eddigieket, a 7q31 amplifikáció kedvezőtlen prognózissal társul, és a csökkent CAV1 fehérje mennyiség hatást gyakorolhat a melanoma sejtek inváziójára. Míg a TES szerepet játszhat a cirkuláló tumor sejtek kihorgonyzásában meghatározva az áttét lokalizációját. Mindamellet a régió melanoma genesisben betöltött szerepe további vizsgálatokat igényel. Mivel a daganatok kialakulása és fejlődése egy rendkívül összetett, nagyszámú gént és molekuláris útvonalat érintő folyamat, ezen alterációk együttes, rendszer szemléletű vizsgálata szintén fontossá válhat a jövőben.

CCND1 gén alterációk, BRAF és NRAS mutációk szerepe a primer melanoma progresszióban

Gast és munkatársai molekuláris szinten két különböző útvonalon kialakuló melanoma alcsoportot azonosítottak. Az első csoport azokat a melanomákat foglalja magába, melyek BRAF vagy NRAS mutációt hordoznak együttesen a CDKN2A és PTEN tumorszupresszor lokuszok eltéréseivel és főként a bőr napsugárzásnak kitett felületein alakulnak ki. Míg a második csoportba tartozó léziók számos onkogén amplifikációval, mint MYC vagy CCND1 jellemezhetők, melyek együttesen fordulnak elő a 13q és 16q régiók vesztésével. A különböző molekuláris karakterű melanoma típusok feltérképezése a jövőben lehetővé teheti olyan betegcsoportok azonosítását, akik adott molekulákat célzó terápiákra kedvező választ adhatnak.

A CCND1 kópiaszám eltéréseinek szerepét együttesen a RREB, MYC és 6-os kromoszóma kópiaszám változásaival széles körben tesztelik a melanocita eredetű léziók diagnosztikájában és klasszifikációjában FISH technikát alkalmazva. A korábbi genetikai tanulmányok a CCND1 gén amplifikációját elsősorban akrális melanomákhoz kapcsolták. Továbbá a krónikus napsugárzásnak kitett testfelszíneken kialakuló melanomákban is gyakori CCND1 kópiaszám növekedést figyeltek meg, mely inverz módon korrelált a különböző BRAF mutációk jelenlétével. Mivel a CCND1 számos, melanoma progresszióban jól ismert és újonnan feltárt molekuláris útvonal fontos transzkripciós targete, ezért jelen disszertáció céljai közé tartozott a CCND1 kópiaszám és expressziós változások tanulmányozása primer

kután melanomákban a BRAF és NRAS gének mutációs státuszát és expresszióját is figyelembe véve. Célunk volt továbbá a CCND1 amplifikáció BRAF és NRAS eltérésektől független lehetséges prognosztikai szerepének vizsgálata is.

Az American Joint Committee on Cancer (AJCC) társaság által kiadott megegyezés alapján a Breslow tumor vastagság és a felszíni kifeléelyesedés a túlélés leghatékonyabb független prediktora. Saját eredményeink azt mutatják, hogy a CCND1 genetikai és gén expressziós változásai befolyásolják a metasztatikus potenciált, Breslow vastagságot, túlélést, ulcerációt és a korábban még nem vizsgált áttétképzés módját is. A többszörös áttéttel rendelkező léziók ugyanis szignifikáns emelkedést mutatnak a gén kópiaszámban, ugyanakkor csökkenést a CCND1 mRNS szintben. Habár ez utóbbi esetben további vizsgálatok szükségesek a viszonylag alacsony mintaszám miatt. Az áttétképzés lehetséges helyének molekuláris eltérés mintázatok alapján történő predikciója a jövőben kiemelkedő fontosságú lehet. A CCND1 genetikai alterációk, mRNS és fehérje expressziós eltérések között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Ennek egyik oka lehet az átfedő minták viszonylag alacsony elérhető száma. Másrészt, hasonlóan a 7q31 vizsgálatoknál, nem tapasztaltuk a CCND1 gén homozigóta vesztését, így a fennmaradó gén kópia még elegendő lehet a zavartalan mRNS szintézishez. Továbbá, az amplifikáció nem feltétlen érinti a teljes gént vagy az amplifikált szakaszok/gén kópiák nem funkcionálnak megfelelően. Végül az ebben a tanulmányban nem vizsgált CCND1 expressziót befolyásoló epigenetikai folyamatok is szerepet játszhatnak a kapott eredményben.

A CCND1 fehérje szint szignifikáns asszociációban állt a Breslow tumor vastagsággal (fokozott protein mennyiség a vastag léziókban, hasonlóan Oba és munkatársai megfigyeléseihez). Azonban, a fehérje megoszlás heterogén volt a különböző kategóriákban és a szignifikancia, a protein festődési erősség mellett a pozitív sejtek számának figyelembe vételét is követően (quickscore kiértékelés) eltűnt. Az eredmények tisztázására ezért különböző biológiai tulajdonságú melanoma sejtvonalakon végeztünk vizsgálatokat, melyek azt mutatták, hogy az agresszív, nagy kolonizáló kapacitású primer tumor eredetű HT199 erősebben expresszálta a CCND1 fehérjét, az invazív, nude egerben nem tumorkeltő WM35-höz viszonyítva. Míg a metasztázisból származtatott WM983B-t viszonylag gyenge fehérje festődés jellemezte. Korábbi tanulmányok a CCND1 protein expresszió progresszív fokozódását írták le a malignus transzformáció során, ezzel ellentétben az előrehaladott tumorokra a fehérje szint csökkenése volt inkább karakterisztikus. Saját eredményeink szerint a többszörös áttétképző primer melanomákban csökkent CCND1 mRNS és fehérje szint

mutatható ki, mely a molekulának a melanoma progresszió korai stádiumaiban betöltött szerepére utalhat. A CCND1 expresszió szintjének ezt a fluktuációját a tumor sejt proliferáció és migráció közötti speciális kapcsolat is eredményezheti, hasonlóan a nem rég emlő daganatokban talált jelenséghez. Miszerint a nyugalmi (G0/G1 fázis) állapotban levő sejtek fokozott migrációs kapacitással rendelkeznek, szemben a proliferáló sejtekhez, mely utóbbi folyamatban a CCND1 molekulának központi szerepe van. Azonban, a tumor sejt migráció CDK független modulációját is leírták már, mely számos transzkripciós faktor általi közvetlen szabályozáson keresztül valósul meg. Ezért a CCND1 protein egy komplex multimolekuláris mechanizmus tagjaként hatását molekuláris interakciókon keresztül, precízen kontrollált módon fejt ki a melanoma sejtek életére.

A BRAF és NRAS gének mutációs státuszát is figyelembe véve, a vad típusú géneket hordozó, CCND1 amplifikált léziók gyakrabban alakultak ki napsugárzásnak kitett bőrfelületeken, és a CCND1 mRNS szint szintén magasabb volt a vad BRAF és NRAS génekkel rendelkező melanomákban. Ezek az eredmények megerősítik azon korábbi elméleteket, miszerint a CCND1 alterációk más úton alakulnak ki, mint a BRAF vagy NRAS mutációk, így előfordulásuk különböző melanoma alcsoportokhoz köthető. Azonban, a CCND1 amplifikáció illetve BRAF/NRAS mutációk nem voltak teljesen kizárólagosak, valamint a CCND1 mRNS expresszió is mutatott közepes mértékű pozitív korrelációt a BRAF és NRAS expressziós szintekkel. Ez arra utal, hogy mind a CCND1 molekulának, mind pedig a szignalizációs kaszkádban felette szereplő molekuláknak létezhet egymástól független hatása a progresszióra vagy épp kooperációjuk révén fokozhatják többek között a gyógyszerrezisztenciát. Saját mintáinkat vizsgálva nem találtunk jelentős korrelációt a CCND1 mRNS és fehérje szintek között. Ennek több oka is lehet, melyek főként az egyéb szabályozó molekuláknál bekövetkezett változások transzhatásai. Egyrészt a protein degradáció deregulációja, melyet a ROC1 fehérje kontrollál, így a ROC1 expresszió csökkenése emelkedett CCND1 szintet eredményezhet az mRNS expresszió fokozódása nélkül is. Másrészt zavar támadhat a CCND1 mRNS szint nemrég felfedezett miR-193b mikro RNS által vezérelt poszttranszkripciós degradációjában is.

Habár a CCND1 genetikai alterációk és gén expressziós változások hatással lehetnek a kután melanoma progresszióra, érdemes lenne a vizsgálatokat nagyobb esetszámú mintapopuláción is elvégezni a borderline összefüggések tisztázására. Hasznos lenne továbbá a primer daganatokban feltárt CCND1 alterációk összevetése a belőlük származó áttétekben

található eltérésekkel is. Végül a melanómára karakterisztikus intratumorális heterogenitás számos problémát vet fel és elfedhet néhány fontos összefüggést.

Számos kutatócsoport folytat jelenleg is olyan vizsgálatokat, melyek a malignus melanomák molekuláris hátterének mélyebb megértését célozzák meg. Azonban a betegség nagy komplexitásának köszönhetően az eredmények limitáltak és számos kérdés vár tisztázásra. Ezért kiemelkedően fontos olyan biológiai markerek identifikálása, melyek elősegítik a daganat agresszív viselkedésének prognózisát. Eredményeink szerint mind a CCND1 alterációk, mind pedig a 7q31-es lokusz alterációi, az itt lokalizálódó CAV1 és TES gének eltéréseivel együtt prognosztikai jelentőséggel bírhatnak a melanoma progresszióban és az áttétképző hajlamban. Végül a CCND1 genetikai eltérések és a BRAF/NRAS aktiváló mutációk között feltárt interakciók kihangsúlyozzák a malignus melanoma rendszer szintű szemléletének fontosságát is.

Főbb megállapítások és eredmények

A doktori disszertációban összefoglalt vizsgálatok célja volt olyan gének (CCND1, BRAF, NRAS) illetve lokuszok (7q31) genetikai és gén expressziós eltéréseinek vizsgálata, melyek szerepet játszhatnak humán melanomák progressziójában. Célunk volt továbbá a fent említett eltérések és a primer daganatok klinikai-patológiai jellemzői közötti összefüggések átfogó analízise is.

1. A 7q31 kópiaszám eltéréseinek primer melanomákban és áttétekben végzett FISH analízise szignifikáns összefüggést mutatott ki a kedvezőtlen klinikai kimenetellel.
2. A 7q31-es lokuszon elhelyezkedő CAV1 és TES gének mRNA expressziós analízise csökkent CAV1 kifejeződést tárt fel vastag melanomákban, és a TES mRNA szint csökkenését a többszörös áttétképző primer mintákban; míg azok a léziók, melyek csupán kután vagy nyirokcsomó metasztázissal rendelkeztek, emelkedett TES mRNA szinttel jellemezhetők.
3. A CAV1 fehérje szint szignifikánsan magasabb vékony primer tumorokban, míg a TES fehérje expresszió nem mutatott összefüggést egyetlen vizsgált paraméterrel sem.
4. A 7q31 amplifikáció nem vagy csak gyenge korrelációban állt a CAV1 és TES gének mRNA és fehérje expressziós váltoásaival.
5. A CCND1 gén kópiaszám eltéréseinek primer melanomákban szignifikáns összefüggést tárt fel a kedvezőtlen klinikai kimenetellel. Ezt az összefüggést befolyásolta a BRAF és NRAS gének mutációs státusza a napsugárzásnak való kitettség esetében.
6. CCND1 mRNA szint csökkenés figyelhető meg azokban a primer tumorokban, melyek többszörös áttétképzéssel jellemezhetők; és a gén expresszió korrelációt mutat mind a BRAF és NRAS mRNA szintekkel, mind pedig ez utóbbi gének mutációs státuszával.
7. A CCND1 protein fokozott expressziója áttétképzéssel és rövidebb túléléssel társul, valamint a fehérje szint összefüggést mutat a Breslow tumor vastagsággal is.

Eredményeinket összefoglalva, a 7q31-es lokusz és CCND1 gén amplifikációja prognosztikai jelentőséggel bírhat kután melanomák kedvezőtlen klinikai kimenetelével kapcsolatban. Továbbá, az eredmények azt mutatják, hogy a CAV1, TES és CCND1 gének expressziós eltérései is számos szempontból befolyásolhatják a tumor biológiai viselkedését.



Iktatószám: DEENKÉTK/101/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Vízkeleti Laura

Neptun kód: LG7VT5

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

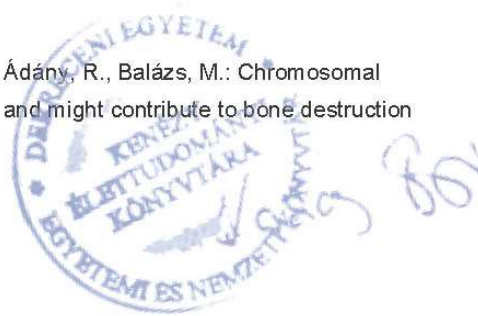
1. **Vízkeleti, L.**, Ecsedi, S., Rákosy, Z., Orosz, A., Lázár, V., Emri, G., Koroknai, V., Kiss, T., Ádány, R., Balázs, M.: The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma.
Tumor Biol. 33 (6), 2189-2199, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0480-6>
IF:2.143 (2011)
2. **Vízkeleti, L.**, Ecsedi, S., Rákosy, Z., Bégány, Á., Emri, G., Tóth, R., Orosz, A., Szöllősi, A., Méhes, G., Ádány, R., Balázs, M.: Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma.
Front Biosci (Elite Ed). E4 (1), 1802-1812, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2741/501>
3. Balázs, M., Ecsedi, S., **Vízkeleti, L.**, Bégány, Á.: Genomics of human malignant melanoma.
In: Breakthroughs in Melanoma Research. Ed.: Yohei Tanaka, InTech, Rijeka, 237-263, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/21339>
4. Lázár, V., Ecsedi, S., Szöllősi, A., Tóth, R., **Vízkeleti, L.**, Rákosy, Z., Bégány, Á., Ádány, R., Balázs, M.: Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma.
Mod. Pathol. 22 (10), 1367-1378, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2009.109>
IF:4.406





További Közlemények

5. Rákosy, Z., Ecsedi, S., Tóth, R., **Vízkeleti, L.**, Herandez-Vargas, H., Lázár, V., Emri, G., Szatmári, I., Herceg, Z., Ádány, R., Balázs, M.: Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration.
PLoS One. 8 (1), e54958, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054958>
IF:4.092 (2011)
6. Lázár, V., Ecsedi, S., **Vízkeleti, L.**, Rákosy, Z., Boross, G., Szappanos, B., Bégány, Á., Emri, G., Ádány, R., Balázs, M.: Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization.
Melanoma Res. 22 (3), 202-214, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e328352dbc8>
IF:2.187 (2011)
7. Kito, Y., Saio, M., Gotoh, N., Umemura, N., Nonaka, K., Bai, J., **Vízkeleti, L.**, Törőcsik, D., Balázs, M., Ádány, R., Takami, T.: Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic cell-like signaling in vitro.
Int. J. Oncol. 38 (5), 1409-1419, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2011.960>
IF:2.399
8. Márián, T., Trencsényi, G., Goda, K., Szalóky, G., Juhász, I., **Vízkeleti, L.**, Szöllősi, A., Lajtós, I., Mikecz, P., Krasznai, Z., Szabó, G., Krasznai, Z.T.: The effect of combined treatment blocking p-glycoprotein function measured using MiniPET in xenograft tumor model.
Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur. 14 (Suppl. A.), A23. p., 2011.
9. **Vízkeleti, L.**, Ecsedi, S., Rákosy, Z., Emri, G., Bégány, Á., Szöllősi, A., Méhes, G., Ádány, R., Balázs, M.: Expression alterations of genes located on the 7q31 region in human malignant melanomas.
Eur. J. Cancer. 35 (4), 218, 2009.
10. Ecsedi, S., Rákosy, Z., **Vízkeleti, L.**, Juhász, A., Sziklai, I., Ádány, R., Balázs, M.: Chromosomal imbalances are associated with increased proliferation and might contribute to bone destruction in cholesteatoma.
Otolaryngol. Head Neck Surg. 139 (5), 635-640, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2008.07.019>
IF:1.409





11. Rákosy, Z., **Vízkeleti, L.**, Ecsedi, S., Bégány, Á., Emri, G., Ádány, R., Balázs, M.: Characterization of the 9p21 copy number alterations in human melanoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 182 (2), 116-121, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.01.008>
IF:1.482
12. Rákosy, Z., **Vízkeleti, L.**, Ecsedi, S., Vokó, Z., Bégány, Á., Barok, M., Krekk, Z., Gallai, M., Szentirmay, Z., Ádány, R., Balázs, M.: EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int. J. Cancer.* 121 (8), 1729-1737, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22928>
IF:4.555

Összesített impakt faktor: 22.673

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.549

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.03.08



A témához kapcsolódó konferencia részvételek

Rakosy Z, **Vizkeleti L**, Begany A, Adany R, Balazs M: poster: Amplification of the EGFR gene and the 7q31 locus are associated with metastasis formation of malignant melanomas; 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference 2-7 July, 2005, Budapest, Hungary

Rakosy Z, **Vizkeleti L**, Begány A, Adany R, Balazs M: poster: Amplification of the 7q31 locus is a frequent event in malignant melanoma and associated with extra copies of EGFR gene; ECCO 13 EACR Congress, 30 Oct – 3 Nov, 2005; Paris, France

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

Rákosy Zs, **Vizkeleti L**, Ecsedi Sz, Bégány Á, Ádány R, Balázs M: poszter: Primer malignus melanomák génexpressziós mintázatának elemzése microarray technikával; V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2006. május 4-6., Budapest

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

Balazs M, Lazar V, Rakosy Z, **Vizkeleti L**, Ecsedi S, Begany A, Emri G, Adany R: oral: Array CGH and fluorescence in situ hybridization analyses reveal new genomic alterations in malignant melanoma; MAF10 10th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, 9-12 Sept. 2007 Salzburg, Austria

Vizkeleti L, Lazar V, Ecsedi S, Rákosy Z, Begany A, Adany R, Balazs M: Array Comparative Genomic hybridization Analysis of Cutaneous Melanoma; Marie Curie - Genome Architecture in Relation to Disease: Array techniques to identify copy number variations. Workshop 1, 11 – 15 Sept, 2007, Helsinki, Finland

Vizkeleti L, Szollosi A, Ecsedi S, Rakosy Z, Begany A, Adany R, Balazs M: poster: Altered gene expressions on FRA7G fragile site in human malignant melanoma; ISAC XXIV. International Congress: Cytometry in the Age of Systems Biology, 17-21 May, 2008, Budapest, Hungary

Balázs M, Ecsedi Sz, **Vízkeleti L**, Lázár V, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Ádány R: előadás: A humán melanoma genom diverzitása; VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2009. április 17-19., Nyíregyháza

Vízkeleti L, Ecsedi S, Rakosy Z, Szollosi A, Emri G, Begany A, Mehes G, Adany R, Balazs M: oral: Expression alterations of genes located on the 7q31 region in human malignant melanomas. ECCO 15 - 34th ESMO Multidisciplinary Congress, 20-24 Sept, 2009, Berlin, Germany

Balázs M, Ecsedi Sz, **Vízkeleti L**, Lázár V, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Ádány R: előadás: A melanoma genom heterogenitása, génamplifikációk szerepe a daganatprogresszióban. A Magyar Onkológusok Társaságának XXVIII. Kongresszusa, 2009. november 12-14., Budapest

Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Ádány R, Balázs M: előadás: A 7q31-es lokusz genetikai és gén expressziós eltérései humán melanomákban. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének (NKE) IV. Konferenciája, 2010. szeptember 2-4., Szombathely

Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Orosz A, Lázár V, Rákosy Zs, Koroknai V, Kiss T, Emri G, Ádány R, Balázs M: előadás: Ciklin D1 szerepe malignus melanomák progressziójában. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének (NKE) V. Konferenciája, 2011. augusztus 31. – szeptember 2., Szeged

Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Emri G, Tóth R, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M.: előadás: Genetikai eltérések szerepe humán melanomák progressziójában. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének (NKE) VI. Konferenciája, 2012. szeptember 5-7., Budapest

Balázs M, Ecsedi Sz, **Vízkeleti L**, Lázár V, Emri G, Ádány R: előadás: A melanoma genom eltérései. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének (NKE) VI. Konferenciája, 2012. szeptember 5-7., Budapest

Vízkeleti L, Ecsedi S, Rakosy Z, Orosz A, Lazar V, Emri G, Koroknai V, Kiss T, Adany R, Balazs M: poster: CCND1 as a potential prognostic marker of cutaneous melanomas? CYTO 2012, XXVII Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, 23-27 June, 2012, Leipzig, Germany