

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Genetikai eltérések karakterizálása *BRAF* és *NRAS* mutációt hordozó
humán primer melanomákban**

Lázár Viktória

Témavezető: Balázs Margit, Ph.D., D.Sc.



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013

A doktori értekezés betétlapja

Genetikai eltérések karakterizálása *BRAF* és *NRAS* mutációt hordozó humán primer melanomákban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

Az "Egészségtudományok" tudományágban

Írta: **Lázár Viktória**, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája (Megelőző Orvostan és
Népegészségtan Programja) keretében

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

A doktori szigorati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Puskás László, az MTA doktora
Dr. Dezső Balázs, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013.05.30. 11 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Remenyik Éva, az MTA doktora
Dr. Tóvári József, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Remenyik Éva, az MTA doktora
Dr. Tóvári József, Ph.D.
Prof. Dr. Puskás László, az MTA doktora
Dr. Dezső Balázs, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013.05.30. 14 óra

BEVEZETÉS

A bőrdaganatok legagresszívabb formája a melanoma malignum, incidenciája világszerte folyamatosan emelkedik, a letális daganatok között incidenciájának növekedési üteme a második helyen áll. Áttétképzési hajlama rendkívül gyors, gyógyszer rezisztenciája fokozott, így korai felismerése és pontos diagnózisa a betegség kimenetele szempontjából rendkívüli jelentőséggel bír. Kialakulásában a környezeti faktorok közül kiemelten fontos szerepet játszik az ultraibolya (UV) sugárzás, mely számos előnyös biokémiai hatása mellett súlyos DNS károsító, ú.n. genotoxikus mellékhatással is rendelkezik. Ezen hatását mind közvetlenül, pirimidin dimerek kialakításával, mind közvetett mechanizmusokkal, például az oxidatív stressz által mediált mutációk indukálásával kifejezheti. A melanoma progressziója során a genetikai eltérések sorozatos akkumulációja következtében sérülnek a genom integritását szabályozó molekuláris mechanizmusok, a sejtek normális működését szabályozó jelátviteli folyamatok. A sorozatosan felhalmozódó genetikai eltérések számos kulcsfontosságú jelátviteli útvonalat érintenek, melyek eredményeként a keratinociták melanocitákra gyakorolt szabályozása sérül, ez folyamatos melanin termeléshez és kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezet. Ismert ugyan, hogy a tumor sejtek evolúciója diverz, megjósolhatatlan és sztochasztikus folyamat, ugyanakkor számos alkalommal bizonyítást nyert, hogy különböző kromoszómális eltérések nem véletlenszerű mintázatokban, hanem jól elkülöníthető módon jelennek meg. Utóbbi megfigyelést támasztja alá a széles körben elfogadott ú.n. klonális evolúciós elmélet, mely szerint a tumoros sejtek osztódása során azoknak a rosszindulatú klónoknak a pozitív szelekciója valósul meg, melyek a már felhalmozott genetikai és epigenetikai eltérések által elkerülhetik az immunrendszer védelmi vonalait és képessé válnak áttét kialakítására távoli szövetekben.

A humán genom szekvenálása, a microarray technológia és bioinformatika napjainkban történő ugrásszerű fejlődése lehetővé tette egy új tudományág, a genom léptékű molekuláris genetika létrejöttét. A genomika forradalmian új eredményeket hozott, új módszertani megközelítések alkalmazásával, integrált genomikai analízisekkel lehetővé vált a betegségek kialakulásában és progressziójában szerepet játszó specifikus eltérések, molekuláris célpontok azonosítása. Az elmúlt évtizedek intenzív molekuláris genetikai/genomikai kutatásainak eredményeként számos daganatban több olyan célmolekulát fedeztek fel, melyekre alapozva sikeres személyre szabott terápiát lehetett tervezni. Példaként említhetjük a már klinikai gyakorlatban is alkalmazott terápiás eljárások közül az EGFR receptor célzott gátlásán alapuló, vastagbél daganatos betegeknél alkalmazott terápiát, vagy emlődaganatos betegek kezelésére alkalmazott HER2 receptorok gátlását célzó trastuzumab-terápiát.

Számos kutatás foglalkozott a primer melanomák tumorigenezisének korai fázisában megjelenő *BRAF* és *NRAS* onkogének aktivációs mutációjának vizsgálatával, annak tanulmányozásával, hogy ezeknek az onkogén alterációknak milyen szerepe van a melanoma progresszió során. Mindkét onkogén a MAP-kináz foszforilációs kaszkárendszer tagja, aktivációs mutációik nagy jelentőséggel bírnak a melanoma progressziójában, azonban még továbbra is nyitott az a kérdés, hogy milyen genom eltérésekkel együttesen vesznek részt a daganat kialakulás és progresszió folyamatában. A mutációk jelenléte vagy hiánya alapján három melanoma alcsoport különíthető el: *BRAF* mutációt hordozó, *NRAS* mutációt hordozó, illetve mindkét mutációra vad allélt hordozó melanomák alcsoportjai. Irodalmi adatok alapján a két aktivációs mutáció nagyon ritkán fordul elő egyazon tumorban. A *BRAF* és az *NRAS* mutációk ígéretes terápiás targetek lehetnek, jelen pillanatban is több számos célzott kutatás folyik a *raf* kináz fehérje gátlását eredményező vegyületek klinikai tesztelésére. A biztató eredmények ellenére is igen gyakran lép fel a kináz gátlókkal szemben rezisztencia, ami azt is jelenheti, hogy több célpont egyidejű gátlása szükséges a daganat progressziójának megállítására.

Vizsgálataink során kiemelt figyelmet szenteltünk a *BRAF* és *NRAS* mutációt hordozó primer melanomák jellegzetes molekuláris eltéréseinek megismerése mellett annak kiderítésére, hogy a két onkogén mellett melyek azok a gének, amelyek módosíthatják a MAPK jelátviteli útvonal működését. Célunk volt olyan genetikai eltérések azonosítása, melyek akár új specifikus terápiás targetet is szolgáltathatnak, a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett.

Munkánk második részében a 11q13 régióban lokalizálódó onkogének koamplifikációs mintázatát vizsgálatuk, hiszen ennek a génszakasznak a gyakori amplifikációját a primer melanoma progressziójával összefüggésbe már több független vizsgálat, beleértve saját munkánkat is kimutatta. A régió feltételezhető target génje, a *CCND1* mivel nagyon gyakran figyelték már meg nagymértékű expresszióját több különböző szolid tumor esetében, mint emlő-, fej-nyak- valamint hólyagdaganatok. A *CCND1* mellett azonban számos más onkogén illetve daganat kialakulásával összefüggésbe hozható gén található még ebben az amplikonban, mint a *TAOS1*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF19* és *EMS1*. Ez utóbbi gének szerepét a 11q13 kromoszómális régióban még nem vizsgálták részletesen primer melanomákban. Ennek okán célul tűztük ki, hogy ezen gének genetikai eltéréseit illetve a melanoma progresszióban betöltött szerepüket részletesen megvizsgáljuk primer illetve metasztázis melanomák esetében egyaránt.

CÉLKITŰZÉSEK

Irodalmi adatok alapján a *BRAF* és *NRAS* mutációk a melanoma tumorigenezis korai szakaszában jelennek meg, majd a tumor progresszió során a számos más genetikai eltéréssel kooperálva hozzájárulnak a melanomák inváziójához és áttétképzéséhez.

Vizsgálataink során célul tűztük ki a *BRAF* és *NRAS* mutációt hordozó daganatokra jellemző specifikus genetikai eltérések beazonosítását, valamint a 11q13 amplifikációs régió génelteréseinek részletes tanulmányozását, melyet korábbi CGH vizsgálataink során a melanoma egyik leggyakoribb genetikai eltéréseként azonosítottunk.

Célunk volt:

1. *BRAF* vagy *NRAS* mutációt hordozó, illetve vad *BRAF/NRAS* genotípusú melanomákra jellemző genetikai eltérések összehasonlítása array CGH analízissel,
2. annak felderítése, hogy a *BRAF* és *NRAS* mutáció mellett mely gének eltérései módosíthatják a MAPK jelátviteli útvonal működését,
3. az eltérő genotípusú melanomákban a különböző jelátviteli útvonalakban és útvonalak közötti interakcióban résztvevő gének eltéréseinek vizsgálata,
4. 11q13 lókusztól gényeinek (*CCND1*, *FGF3*, *FGF19*, *FGF4*, *EMS1*, *TAOS1*) ko-amplifikációs mintázatának feltérképezése,
5. a 11q13 lókusztól gényeinek melanoma prognózisban betöltött szerepének, valamint a kópiaszám-eltéréseik és a *BRAF*-, illetve *NRAS*-mutációk jelenléte közötti korrelációnak a vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Melanoma szövetminták

A humán melanoma szövetek a DE OEC Bőrgyógyászati Klinikáról származtak, ahol előzetes szövettani analízisüket is elvégezték. A vizsgálat a DE OEC Etikai Bizottságának engedélye alapján és irányelvei szerint történt.

Negyven hét primer melanoma szövetből izoláltunk DNS-t array CGH elemzésre, majd ezt követően 68 és 6 metasztázis daganatnál térképeztük fel részletesebben a 11q13 régióban lokalizálódó gének kópiaszám eltéréseit Q-PCR analízissel. DNS-t friss vagy fagyasztott daganat mintából preparáltunk DNS-t G-spin Genomic DNA Extraction Kit-tel (Macherey-Nagel, Düren, Germany), melyet NucleoSpin® Extract II kit-tel (Macherey-Nagel) tisztítottunk. A DNS koncentrációját és minőségét NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies,

Wilmington, Delaware USA) spektrofotométer berendezéssel határoztuk meg. A primer daganatok közel 60%-a ulcerált felszínű, 45% >4mm vastagságú, 40%-a noduláris altípusú rossz prognózissal jellemezhető lézió volt.

***BRAF* és *NRAS* mutáció detektálása**

A *BRAF* kodon 600 és *NRAS* kodon 61 mutációinak genotipizálását LightCycler real time PCR rendszerben (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) végeztük, valósídejű polimeráz-láncreakciót (real-time PCR) követő olvadáspont analízissel, fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próbákkal (primerek és próbák: TIB Molbiol, Berlin, Németország). A mutációt hordozó minták pontos genotípusát szekvenálással állapítottuk meg. A szekvenálást a BIOMI kft. (Gödöllő) végezte, az előzetes PCR során használt egyik, a célnak megfelelő PCR primer segítségével.

Array komparatív genom hibridizáció (array comparative genome hybridization, array CGH)

A CGH a fluoreszcencia in situ hibridizáció elvén alapuló molekuláris genetikai módszer, melynek segítségével a tumor sejt genomban előforduló ismert és ismeretlen génamplifikációs és géndeléciós események egyaránt detektálhatóak, valamint lehetőség nyílik a genetikai eltérések kromoszómális szintű feltérképezésére is. Az array CGH módszer során a tárgylemezre pontosan ismert lokalizációjú, klónozott DNS szekvenciák ezreit, vagy különböző méretű oligonukleotidokat rögzítenek, és ehhez hibridizálják hozzá az eltérő módon jelölt normál és tumor DNS-t. Az array CGH analízis a teljes humán genomot lefedő 2464 BAC (bacterial artificial chromosome, mesterséges bakteriális kromoszóma) klónt tartalmazó array chip lemezen történt (HumArray3.1 chip) a Comprehensive Cancer Center intézetével együttműködésben (University of California, San Francisco, USA). Az array CGH adatok feldolgozása a SPOT 1.2 és SPROC 1.1.1 szoftvercsomaggal történt.

Az Array CGH adatok elemzése

Az UCSC genome browser weboldal (<http://genome.ucsc.edu/>) segítségével az array CGH során használt BAC klónokat a humán genomra térképeztük. Az X és Y kromoszómán lokalizálódó oligonucleotid próbákat és az ismert genom variánsokat (Database of Genomic Variants: <http://projects.tcag.ca/variation/>) kizártuk a további elemzésből. A log₂ transzformált adatokat a CGH-Explorer software 3.2 segítségével értékeltük ki. Szignifikáns eltérésnek a többszörös összehasonlítási korrekciót (FDR, false discovery rate) követő P≤0,01 értéket tekintettük. Határértékként egy, az irodalomból ismert és gyakran használt értéket

alkalmaztunk a nagymértékű amplifikációt ($>0,55 \log_2$ rate), illetve a homozigóta deléciót ($<0,8 \log_2$ rate) mutató régiók azonosítására.

Fisher's exact tesztet végeztünk azoknak a BAC klónoknak az azonosítására, melyek az eltérő *BRAF* és *NRAS* genotípusú primer melanoma alcsoportok között szignifikáns eltérést mutattak. Annak érdekében, hogy az alcsoportok között eltérést mutató nagyobb kromoszómális régiókat is azonosítsuk, 5 BAC klón \log_2 transzformált értékein egy mozgó átlagolást is elvégeztünk, majd Student féle t-teszttel összehasonlítottuk a két csoport átlagos \log_2 értékeit. A nagyszámú vizsgált tulajdonság miatt, az álpozitív esetek kizárása érdekében, szintén alkalmaztunk FDR korrekciót.

Azoknak a régióknak a feltérképezésére, melyek alterációi nagy gyakorisággal, együttesen fordulnak elő a különböző melanoma altípusokban, Pearson féle korreláció analízist végeztünk. Az analízis során kizárólag azokat a BAC klónokat vettük be az analízisbe melyek kópia szám gyakorisága eltérést mutatott az egyes melanoma alcsoportokban ($>40\%$ vagy $P<0,3$). Valamennyi analízist az R statisztikai programmal végeztük el (<http://www.r-project.org/>).

Jelátviteli útvonalakhoz rendelhető genetikai eltérések elemzése

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

Random Forest analysis

Munkánk során a microarray vizsgálatok további elemzéséhez a fent említett statisztikai számítások mellett Random Forest algoritmust használtunk, mely az adatbányászatban egy gyakran alkalmazott prediktív modellező technika. Az R statisztikai program Random Forest csomagját használva kiválasztottuk, hogy a *BRAF* mutációk mellett mely gének eltérései módosíthatják a MAPK jelátviteli útvonal működését (a *BRAF* onkogén az EGF/MAPK útvonal fő aktivátora, a melanoma kialakulásáért főként ennek az útvonalnak az aktiválása felel). Először a módszerrel kiválasztottuk a tizenöt legfontosabbnak jelölt ú.n. klasszifikátort

(géneket) az EGF/MAPK jelátviteli útvonalból, majd keresztvalidációval megbecsültük, hogy mekkora valószínűséggel tudja a modellünk csupán ezen klasszifikátorok eltéréseire alapozva a megfelelő daganat típusba (*BRAF* mutációt hordozó daganatok) sorolni a mintáinkat.

Klaszter analízis

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

DNS kópiaszám vizsgálata kvantitatív real-time PCR-el (Q-PCR)

A kísérletek során használt primereket a Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) és Primer3 (Whitehead Institute, Cambridge, USA) programok segítségével terveztük. A másodlagos struktúrák – például „hajtú” formációk – elkerülésének érdekében igénybe vettük a hálózatról elérhető MFOLD version 3.2 szoftvert is (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>).

A Q-PCR reakció kivitelezéséhez a Power SYBR-Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakcióelegy az általunk tervezett primereket 100-300nM koncentrációban tartalmazta. Az ABI PRISM[®] 7000 készüléken kivitelezett reakció beállításai a következők voltak: 95°C-on egy 10 perces aktivációs szakaszt egy 40 ciklusból álló reakció követett: 95°C-on 15 másodperc, 60°C-on 1 perc.

Eredményeink kiértékelését két belső kontroll génnel kiegyenlített relatív mennyiségi meghatározással végeztük. A vizsgálni kívánt target gén mennyiségét két, általunk validált referencia gén (*GNS*, *UBE2E1*) kópiaszámára vonatkoztattuk, melyek fluoreszcencia-intenzitása egyenesen arányos volt a kiindulási sejtszámmal. Elvégeztünk továbbá egy, a kalibrációs görbét nélkülöző, hatékonyság korrekcióval módosított relatív mennyiségi meghatározást is, mely lehetőséget adott a különböző hatékonysággal működő reakciók korrekt összehasonlítására. A standard görbe meredekségéből számítottuk ki az egyes reakció elegyek PCR hatékonyságát (E = efficiency).

A relatív nukleinsav mennyiség (*Ratio*) meghatározására az alábbi képlet szolgált:

$$Ratio = \frac{(1 + E_{\text{target gene}})^{-\Delta C_T \text{ target gene}}}{\sqrt{(1 + E_{\text{reference gene1}})^{-\Delta C_T \text{ reference gene1}} \times (1 + E_{\text{reference gene2}})^{-\Delta C_T \text{ reference gene2}}}}$$

$E_{\text{target gene}}$ = a PCR reakció hatékonysága a target génre nézve,

$E_{\text{reference gene}}$ = a PCR reakció hatékonysága a referencia génre vonatkozva,

$\Delta C_T_{\text{target gene}}$ = különbség az áttörési ciklusszámban ($C_T = \text{threshold cycle}$) a tumor és kalibrátor DNS között (Applied Biosystems) a target génre vonatkozva.

$\Delta C_T_{\text{reference gene}}$ = különbség az áttörési ciklusszámban ($C_T = \text{threshold cycle}$) a tumor és kalibrátor DNS között (Applied Biosystems) a referencia génre vonatkozva.

Ezt követően az ún. tolerancia intervallum ($TI = 2 \pm 2 \times SD \Delta C_T$, ahol SD: standard deviation) számításával meghatároztuk, hogy a target gének kópiaszáma \pm a standard error (SE) a tumor mintákban szignifikánsan különbözött-e a kontroll mintákban lemerített értékektől. Ehhez felhasználtuk a kontroll DNS mintákban mért ΔC_T értékek átlagos szórását.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

***BRAF* és *NRAS* onkogén mutáció előfordulási gyakorisága melanomákban**

A *BRAF* 600 kodon a minták 37%-ban, az *NRAS* 61 kodon a szövetek 19%-ban hordozott mutációt. A vizsgált primer melanomák 56%-a hordozott *BRAF* vagy *NRAS* mutációt, ugyanakkor a két mutáció együttes előfordulására egyetlen mintában sem volt példa.

Négy esetben volt lehetőségünk a primer tumor és a hozzá tartozó metasztázis daganat mutációs genotípusának egyidejű meghatározására. Megfigyeltük, hogy a *BRAF* vagy *NRAS* aktivációs mutációt hordozó primer daganatok metasztázisaiban is előfordulnak a mutációk. Szignifikánsan gyakrabban figyeltünk meg *NRAS* mutációt azokban a daganatokban, melyek szövettanilag igazoltan krónikusan napnak kitett területekről származtak ($p=0,005$). Ezt az eredményt magyarázhatja, hogy az *NRAS* 61 kodonjában egy TT szekvencia található, ahol az UV sugárzás indukálta cikloaddició nagyobb valószínűséggel történik meg.

Eredményeink megerősítik az eddigi tudományos megfigyeléseket, melyek szerint ezek a mutációk gyakoriak a primer melanomákban és valószínűleg a tumor prognózisa során végig fennmaradva hozzájárulnak a daganat agresszív viselkedéséhez.

Primer melanomák gén kópiaszám eltéréseinek analízise array CGH-val

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

Megfigyelésünk szerint a *BRAF* mutációt hordozó daganatokban szignifikánsan magasabb a kópiaszám eltérések száma a *BRAF* és *NRAS* mutációt nem hordozó melanoma szövetekhez képest (Mann-Whitney teszt; $p=0,04$ és $p=0,01$, a DNS többletekre és hiányokra külön-

külön).

Elemeztük továbbá genom szinten az eltérések frekvencia eloszlását a mutációs csoportokon belül. Megállapítottuk, hogy a *BRAF* mutációs csoportba tartozó daganatokban a 7-es kromoszóma DNS többlete, továbbá a 10-es kromoszóma DNS hiánya dominál, mely minden esetben érinti a *BRAF* (7q34) onko- és *PTEN* (10q23.3) tumorszupresszor gén kromoszómális lókuszt is. Mindebből az következik, hogy a *BRAF* gén a korai stádium mellett feltételezhetően a daganat progresszív előrehaladásában is jelentőséggel bír. A 10q kromoszóma kar hierarchikus klaszter analízise ugyancsak rávilágított, hogy az itt megfigyelhető nagymértékű deléciós mintázat (~40 MB) főleg az előrehaladott stádiumú, illetve *BRAF* mutációt hordozó daganatokra jellemző. Korábbi tanulmányok is foglalkoztak már a *PTEN* (10q23.3) tumorszupresszor gén szerepével melanomákban, így ezek alapján feltételezhetjük, hogy a 10q kromoszóma karon bekövetkező deléció a *BRAF* mutációval együttesen vesz részt a melanomagenezisben. A leggyakoribb nagymértékű amplifikáció a 7q36.3 régióban figyelhető meg, ami ugyancsak a *BRAF* mutációt hordozó melanomákra jellemző elsősorban. Ezen a régió lokalizálódik a *PTPRN2* onkogén, amelynek szerepét kiterjedten vizsgálták emlő daganatokban, hiszen más típusú daganatok esetében a gén termék inhibíciója által már sikeresen tudták csökkenteni a metasztatikus áttétek számát. *NRAS* mutációkat hordozó primer tumorokra elsősorban a 11q23.3-11q25 lókuszt deléciója volt jellemző. Ezen a lókuszon található az egyik ismert tumorszupresszor gén, az *OPCML*, mely a receptor tirozin kinázok negatív regulációján át fejt ki hatását. A másik *NRAS* mutációval összefüggésbe hozható gyakori deléciót a 17p13.3 kromoszómális régióban figyeltük meg, ahol eddig két új tumorszupresszor gént azonosítottak (*HIC1* és *OVCA1*), illetve megfigyelték, hogy ez a lókuszt hemizigóta állapotban sejtciklus deregulációt vált ki és tumorigenezist indukált. Mind a *BRAF*, mind az *NRAS* mutációt hordozó melanomák gyakran hordoztak amplifikációt a 6p22.3 (*E2F3*) és deléciót a 9p21 (*CDKN2A*) kromoszómális régióban. A két onkogén mutációját nem hordozó vad típusú mintákban gyakori DNS többletet találtunk a 17q24-17q25 kromoszómális szakaszon, illetve DNS hiányt a 4q23-q25 régióban.

Kromoszómális alterációk korrelációs elemzése

Erős pozitív korrelációt (korrelációs koefficiens >0,7) mutattunk ki a *BRAF* mutációt hordozó daganatokban az 1p-4q és 14q kromoszóma kar és a 4q-11q13 deléciós mintázatait, illetve a 7q-20p12 kromoszóma kar amplifikációs mintázatait között.

A *BRAF* és *NRAS* mutációt nem hordozó vad típusú daganatokban viszont erős negatív

korrelációt találtunk (korrelációs koefficiens $<-0,7$) a 4q13 DNS hiány, 14q és 17q kromoszóma kar DNS többlete, valamint a 7q deléciója és a 17p amplifikációja között. Emellett pozitív korreláció volt a 14q és 17q25 régiók amplifikációs mintázata között.

A *BRAF* mutáció jelenlétével összefüggésbe hozható gén alterációk felderítése a MAPK jelátviteli útvonalban

A MAPK útvonalból a Random Forest osztályozó segítségével kiválasztottunk 15 *BRAF* mutációval összefüggésbe hozható gén kópia szám eltérést számos ismert (pl: *EGFR*, *PI3K*, *JNKK2*) és kevésbé ismert (pl: *PEA15*, *ELK4*, *SHC1*) onkogénnel. Továbbá detektáltunk egy érdekes deléciós mintázatot, amely a *BRAF* mutáció jelenlétével összefüggésbe hozható. Ezek közül kiemelném a *PTEN*, *JNK1* és *HVH-3* ismert tumorszupresszor gének együttes delécióját. A *PTEN* egy jól ismert tumorszupresszor gén melanomákban, ellenben a *HVH3* és *JNK1* gének melanomában betöltött szerepéről igen kevés információ áll rendelkezésre. Az irodalomban fellelhető legújabb eredmények alapján a *HVH3* génről ismert, hogy az *ERK2* gén inaktivációjáért és specifikus lokalizációjáért felelős, melyet célzottan támadva már sikerült a daganatok növekedését sikeresen gátolni. A *JNK1* transzformált egerekben pedig spontán belső szervi daganatok kialakulását detektálták.

A jelátviteli útvonalak közötti interakciók eltéréseink vizsgálata *BRAF* mutációt hordozó primer melanomákban

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

11q13 kromoszómális régió lokalizálódó onkogének ko-amplifikációs mintázata és ezek prognosztikai jelentősége

Az array-CGH eredményeink alapján az egyik gyakori genetikai eltérésként azonosított

11q13 lókuszt amplifikációs klaszter génjeinek vizsgálatára Q-PCR módszert dolgoztunk ki. A vizsgált primer melanomák 32%-ában mutattuk ki a *CCND1* gén amplifikációját. Négy esetben lehetőségünk volt a beteg primer daganat, valamint a metasztázis profiljának összehasonlítására. Eredményeink alapján mind a 4 primer melanoma, azonban mindössze egy metasztázis hordozott *CCND1* amplifikációt, melynek jelenléte nem mutatott szignifikáns összefüggést egyik prognosztikailag fontos klinikopatológiai paraméterrel sem. A *CCND1* gén amplifikáció jelenléte nem mutatott szignifikáns összefüggést egyik prognosztikailag fontos klinikopatológiai paraméterrel sem.

A *CCND1* amplifikációt hordozó mintákban tovább vizsgáltuk a 11q13 lókuszt öt potenciális onkogénjének (*TAOS1*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF19* és *EMSI*) ko-amplifikációs mintázatát. A minták 18%-ában mutattuk ki a további öt onkogén együttes amplifikációját, továbbá a daganatok 46%-ában figyeltük meg a *TAOS1* gén amplifikációját.

Bár szignifikáns különbséget nem találtunk a 11q13 régióban lokalizálódó onkogének ko-amplifikációs mintázatát vizsgálva a különböző *BRAF* vagy *NRAS* mutációt hordozó daganatcsoportokban, megfigyeltük, hogy ezeknek a géneknek a *CCND1*-el történő együttes amplifikációja a vastag daganatokban (>9mm Breslow vastagság) gyakrabban fordult elő ($p < 0,01$). Megállapítottuk viszont, hogy a *TAOS1* gén amplifikációjának és a *BRAF* vagy *NRAS* onkogén mutációjának a *CCND1* emelkedett gén dóziséval való együttes előfordulása szignifikánsan gyakoribb a rosszabb prognózisú és kifeléyesedő felszínű daganatokban ($p < 0,028$).

Eredményeink szerint a 11q13 régióban lokalizálódó kandidáns onkogének eltérései illetve a *BRAF* vagy *NRAS* mutációk jelenléte a *CCND1* emelkedett géndóziséval társulva a daganatok rosszabb prognózisát eredményezik.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

Vizsgálataink során fő célunk volt a *BRAF* és *NRAS* mutációk prevalenciájának meghatározása, továbbá azoknak a specifikus genetikai eltéréseknek a feltérképezése, melyek

alapján a *BRAF* vagy *NRAS* mutációt hordozó primer daganatok a két onkogén vad típusú formáját hordozó daganatoktól elkülöníthetőek. A teljes genom eltéréseinek analizésére array-CGH módszert alkalmaztunk. A mutációk jelenlétét fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próbák segítségével, olvadáspont analízissel vizsgáltuk.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy:

- A *BRAF* mutációt hordozó daganatokban a leggyakoribb eltérés az 1-es kromoszóma hosszú karjának (1q23-1q25), illetve a teljes 7-es kromoszómának a DNS-többlete és a 10-es kromoszóma hosszú karjának (10q213-10q26) hiánya. Az *NRAS* mutációt hordozó daganatokra a 11q22.3-11q25 régiót érintő deléció a jellemző. Hierarchikus klaszter analízis alapján a 10-es kromoszóma hosszú karjának deléciója szignifikánsan gyakrabban fordult elő a *BRAF* mutációt hordozó és előrehaladott stádiumú primer daganatokban.
- Korrelációs analízissel további kromoszóma lókuszokat azonosítottunk, amelyek genetikai eltérései nagy gyakorisággal, együttesen fordulnak elő a különböző genotípusú primer daganatokban.
- Eredményeink elemzése során, egy új adatbázis (Signalink) segítségével, a genetikai eltéréseket különböző jelátviteli útvonalakban szerepet játszó génekhez kapcsoltuk. A különböző jelátviteli útvonalak dinamikus kölcsönhatásainak részletes vizsgálatával felderítettük, hogy a *BRAF* mutációt hordozó daganatokban leggyakrabban a MAPK-JAK szignalizációs útvonalak közötti interakcióban résztvevő gének sérülnek.
- Random Forest analízis segítségével azonosítottuk a *BRAF* mutációhoz társuló gén kópiaszám eltéréseket a MAPK útvonalból.
- A 11q13 régió részletes vizsgálatát követően feltételezzük, hogy az ebben a régióban lokalizálódó kandidáns gének ko-amplifikációja, a *BRAF* vagy *NRAS* mutációval és a *CCND1* emelkedett géndózisával társulva gyakrabban jellemző rossz prognózisú daganatokra, mint ezen genetikai eltérések jelenléte külön-külön.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy annak ellenére, hogy az *NRAS* és a *BRAF* onkogén aktivációs mutációi ugyanazon szignáltranszdukciós útvonalat aktiválják, a primer melanomák tumorigenezise során eltérő genetikai alterációkkal kooperálnak. Ez a melanoma progresszió során tapasztalt jelenség rendkívül figyelemre méltó, hiszen arra utalhat, hogy a *BRAF* és *NRAS* mutációk egyfajta vezérlő erőként funkcionálnak az alternatív genetikai útvonalakat feltételező melanomagenesis során. Ezen eltérések felfedezése új specifikus

terápiás targetek azonosítására nyújt lehetőséget a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Balázs Margit Tanárnőnek, akinek az irányítása és tudományos útmutatása segítette a Ph.D. munkám elkészítését. Köszönettel tartozom még Prof. Dr. Ádány Róza intézetvezetőnek, hogy támogatásával lehetővé tette, hogy a Megelőző Orvostani Intézetben dolgozhassak. A melanoma minták és részletes adatainak összegyűjtésében vállalt szerepéért köszönettel tartozom Dr. Bégány Ágnesnek és Dr. Emri Gabriellának.

A PhD értekezés elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Lázár V., Ecsedi S., Szölloasi AG., Tóth R., Vízkeleti L., Rákosy Z., Bégány A., Adány 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.*, 2009 Oct;22(10):1367-78.

IF: 4.406

Lázár V., Ecsedi S., Vízkeleti L., Rákosy Z., Boross G., Szappanos B., Bégány A., Emri G., Adány R., Balázs M. Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res.* 2012 Jun;22(3):202-14.

IF: 2.187 (2011)

Egyéb közlemények:

Barok, M., Balazs, M., **Lazar, V.**, Rakosy, Z., Toth, E., Treszl, A., Vereb, G., Colbern, G.T., Park, J.W., Szollosi, J. Characterization of a novel, trastuzumab resistant human breast cancer cell line. *Frontiers in bioscience*, 2010. 2:627-640.

IF: - (2011)

Vízkeleti L., Ecsedi S., Rákosy Z., Orosz A., **Lázár V.**, Emri G., Koroknai V., Kiss T., Adány R., Balázs M. The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. *Tumour Biol.*, 2012 Sept 23., [Epub ahead of print]

IF: 2.143 (2011)

Rakosy Z, Ecsedi S, Toth R, Vízkeleti L, Herandez-Vargas H, **Lazar V**, Emri G, Szatmari I, Herceg Z, Adany R, Balazs M. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *PLoS One.* 2013;8(1):e54958. Epub 2013 Jan 30.

IF: 4.092 (2011)

Iktatószám: DEENKÉTK/123/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Lázár Viktória

Neptun kód: QYNYLP

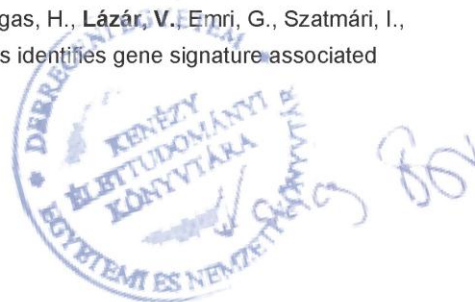
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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)
2. **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

3. Rákosy, Z., Ecsedi, S., Tóth, R., Vízkeleti, L., Hernandez-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)



4. 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)
5. Barok, M., Balázs, M., **Lázár, V.**, Rákosy, Z., Tóth, E., Treszl, A., Vereb, G., Colbern, G.T., Park, J.W., Szöllősi, J.: Characterization of a novel, trastuzumab resistant human breast cancer cell line.
Front. Biosci. (Elite Ed). 1 (2), 627-640, 2010.
6. Balázs, M., Barok, M., **Lázár, V.**, Rákosy, Z., Toth, E., Park, J., Szöllősi, J.: Genomic and gene expression characterization of a novel trastuzumab-resistant breast cancer cell line.
Eur. J. Cancer. Suppl. 6 (9), 119, 2008.

Összesített impakt faktor: 12.828

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.593

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, 2013.03.28



ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

Lázár V., Singh GP., Nagy I., Horváth B., Hrtyan M., Busa-Fekete R., Bogos B., Méhi O., Csörgő B., Pósfai Gy., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Pál Cs. & Papp B. Exploring the network of antibiotic cross-resistance and collateral sensitivity interactions during bacterial evolution. 2012 GRC Drug Resistance Conference, 29 July-3 August 2012, Stonehill College in Easton, MA US

Lázár V., Singh GP., Nagy I., Horváth B., Hrtyan M., Busa-Fekete R., Bogos B., Méhi O., Csörgő B., Pósfai Gy., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Pál Cs. & Papp B. Exploring the network of antibiotic cross-resistance and collateral sensitivity interactions during bacterial evolution. SfAM Summer Conference, 2-5 July 2012, Edinburgh, Scotland, UK

Lázár V., Busa-Fekete R., Fekete G., Singh GP., Kégl B., Pál Cs. & Papp B. Antibiotikum-kölcsönhatások nagy léptékű feltérképezése *Escherichia coli* baktériumban. BJMT Alkalmazott Matematikai Konferencia, 21-23 Június 2012, Győr, Hungary

Lázár V., Busa-Fekete R., Fekete G., Singh GP., Kégl B., Pál Cs. & Papp B. Automated mapping of antibiotic interactions in *Escherichia coli*. Modelling in Life Sciences, 3-5 November 2011, Szeged, Hungary

Lázár V., Busa-Fekete R., Fekete G., Singh GP., Kégl B., Pál Cs. & Papp B. Automated mapping of antibiotic interactions in *Escherichia coli*. IX. Hungarian Congress of Genetics and XVI. Days of Cell and Developmental Biology, 25-27 March 2011, Siófok, Hungary

Lázár V., Ecsedi Sz., Rákossy Zs., Tóth R., Szöllösi A., Emri G., Ádány R., Balázs M.: Characterization of cyclin D1 and other candidate gene amplification in the 11q13 region in human primary melanoma ; ISAC XXIV. International Congress: Cytometry in the Age of Systems Biology, 17-21 May, 2008, Budapest, Hungary

Balázs M., Barok M., Lázár V., Rákossy Zs., Tóth E., Park J., Szöllösi J.: Genomic and gene expression characterization of a novel trastuzumab-resistant breast cancer cell line . XX EACR 05-09, July 2008. Lyon, France

Lázár V., Balázs M., Rákossy Zs., Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Bégány Á., Ádány R.: Humán primer melanomák genetikai karakterizálása array komparatív genomialis hibridizációval. 2007. Ph.D. conference, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, February, 2007., Debrecen, Hungary

Balázs M., Lázár V., Rákossy Zs., Barok M., Treszl A., J., Szöllösi J.: Characterization of a Herceptin® resistant novel breast cancer cell line by CGH and FISH; Marie Curie Conferences and Training Courses on arrayCGH and Molecular Cytogenetic, 13 – 16 September 2006, Leuven, Belgium

Balázs M., Lázár V., Rákossy Zs., Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Bégány Á., Emri G. and Ádány R.: oral: Array CGH and fluorescence in situ hybridization analyses reveal new genomic alterations in malignant melanoma; 2007, Salzburg, Austria

Vízkeleti L., Lázár V., Ecsedi Sz., Rákossy Zs., Bégány Á., Ádány R. and Balázs 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 September 2007, Helsinki, Finland

Ecsedi Sz, Soares-Lima S, Hernandez-Varghas H, Lázár V, Vízkeleti L, Rákósy Zs, Herceg Z, Ádány R, Balázs M; Kópiaszám variabilitás és epigenetika változások primer melanomákban. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének V. Konferenciája; 2011. aug. 31-szept.2. Szeged

Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Orosz A, Lázár V, Rákósy Zs, Koroknai V, Kiss T, Emri G, Ádány R, Balázs M; Ciklin D1 szerepe malignus melanomák progressziójában; Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének V. Konferenciája; 2011. aug.31-szept.2. Szeged

Balázs M, Ecsedi Sz, Vízkeleti L, Lázár V, Rákósy Zs, Bégány Á, Emri G and Ádány R: Diversity of the human melanoma genom; VIII. Hungarian Genetics Congress and XV. Cell and Developmental Biology Conference, 17-19 Apr, 2009, Nyíregyháza, Hungary

Ecsedi Sz, Lázár V, Vízkeleti L, Emri G, Rákósy Z, Balázs M, Adány R. Copy number variation and promoter methylation contribute to transcriptomic profiles associated with malignant melanoma progression. The 4th EMBO Meeting, 22-25 Sept 2012, Nice, France

Vízkeleti L., Ecsedi Sz., Rákósy Zs., Orosz A., Lázár V., Emri G., Koroknai V., Kiss T., Ádány R. and Balázs M. (program no. 396): 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