

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) TÉZISEK

Melanoma progresszióval összefüggő genetikai és génexpressziós változások

Rákosy Zsuzsa

Témavezető:

Dr. Balázs Margit
tanszékvezető egyetemi tanár

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

2008

BEVEZETÉS

Ismert, hogy az elmúlt két évtizedben a melanoma incidenciája, a nők tüdő daganatának kivételével, minden más malignus betegségénél gyorsabban emelkedett. A bőr melanocitáiból kiinduló rosszindulatú daganat - más malignus elváltozásokkal összehasonlítva - kiemelkedő áttétképzési tulajdonságokkal rendelkezik, ezért az elkövetkező években korai felismerése és hatékony gyógyítása szignifikáns népegészségügyi problémává válhat világszerte. A melanoma prognózisának megítélését jelentősen rontja a hatékony terápia hiánya. Jelenleg a lokalizált, kután melanoma kezelése elsődlegesen radikális sebészi beavatkozáson alapul. Sajnos a sebészeti beavatkozások extrém mértékű fokozása nem eredményezte a lokális recidívák és a nyirokcsomó vagy távoli metasztázisok kialakulásának megakadályozását. Ennek oka lehet az, hogy a tumor sejtek agresszív proliferációs tulajdonsága erőteljes invazivitással illetve motilitással társul, és már igen korán kiszabadulnak és távolra vándorolnak a primer tumortól a metasztázis kialakulásáért felelős tumor sejtklónok. Hasonlóan számos szolid tumorhoz, a melanoma is olyan genetikai betegség, melynek kialakulása és progressziója során a genetikai eltérések sorozatos akkumulációja révén sérülnek a génexpressziót szabályozó molekuláris mechanizmusok, melyek onkogének aktiválódását és onkoszuppresszor gének inaktiválódását eredményezik. A gyakori alterációt mutató géneknek, az intenzív kutatások ellenére is, még csak kis hányadát ismerjük. Jelenleg még nincs olyan molekuláris elváltozás, vagy elváltozás sorozat karakterizálva, melyek sikeresen funkcionálhatnának terápiás célpontokként. Ezért kutatásaink során kiemelten fókuszálunk azoknak az alterációknak az azonosítására, melyek a különböző biológiai viselkedésű melanomákra karakterisztikusak, célunk olyan eltérések keresése, melyek diagnosztikus értékűekké válhatnak és hozzájárulhatnak a betegség kimenetelének pontosabb megjósolásához, vagy akár terápiás targetként szolgálhatnak.

Az elmúlt évtizedben tért hódított microarray technikákkal lehetővé vált a tumor genom genetikai eltéréseinek és a gének expressziós mintázatának átfogó analízise, új, eddig ismeretlen betegség specifikus genetikai alterációk azonosítása. Jelentőségük elsősorban abban rejlik, hogy alkalmazásukkal a tumor genom eltérései, és az összes ismert transzkriptomra vonatkozó gyors és átfogó molekuláris analízise valósítható meg. A módszerrel egyetlen kísérlet során genetikai, illetve génexpressziós elváltozások sorozata határozható meg. Ezek az eltérések azokra a kromoszómális régiókra, génekre hívják fel a figyelmet, melyek eltérései specifikusak lehetnek egy adott daganat típusra, továbbá a tumor

progresszió meghatározott stádiumára. Ezekkel a technikákkal nyert információk már több tumornál diagnosztikai és prognosztikai értékűek.

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

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

CÉLKITŰZÉSEK

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

Vizsgálataink során célunk volt:

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Melanoma szövetminták FISH analízisekhez

FISH analíziseinket 81 friss és fagyasztott primer melanoma mintából készített lenyomat preparátumon végeztük el. Az EGFR és 9p21 FISH kísérletek nem azonos időben történtek, így a minták a két elemzés során nem fedtek át.

A melanoma minták a Debreceni Egyetem OEC, Bőrgyógyászati Klinikáról származtak. A vizsgálatokhoz szükséges intézményi Etikai Bizottság engedélyével rendelkezünk. A FISH kísérleteinket tumor mintákból készült lenyomat preparátumokon végeztük el. A lenyomat preparátum előnye a hagyományos metszetekkel szemben, hogy nem kell számolnunk a szignálvesztést eredményezhető metszet készítésből származó genetikai anyag veszteséggel, így módon a FISH értékelése még pontosabbá válik.

DNS próbák

A kísérleteink során alkalmazott DNS specifikus próbák az alábbiak voltak:

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

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

A DNS specifikus próbákat a Vysis cégtől szereztük be. A centroméraspecifikus próbák zölden fluoreszkáló „Spectrum Green”-nel konjugált dUTP-vel, míg a génspecifikus próbák a narancs fluoreszcens fényt kibocsátó „Spectrum Orange”-val kapcsolt dUTP-vel voltak jelölve. A sejtmagok jelzésére diaminofenilindolt (DAPI, kék fluoreszcencia) használtunk, mely antifadeben (Vectashield, Vector USA) volt oldva. A FISH-t az irodalomban leírt protokoll alapján végeztük el, ahol szükséges volt a fluoreszcens szignál intenzitásának növelésére, protokoll módosításokat vezettünk be.

EGFR gén és a 9p21 lokusz kópiaszám eltéréseinek elemzése

Az EGFR génamplifikációs mintázat ellenőrzésére az irodalomban leírt gén kópiaszám kategóriákat alkalmaztuk az alábbiak szerint: *EGFR* génkópiaszám eltérések: i.) *EGFR* *delécio*: ha az EGFR kópiaszáma kevesebb a 7-es centroméra kópiaszámánál a sejtek több mint 10%-ában, ii.) *látszólagos amplifikáció*: 7-es centroméra és az EGFR gén kópiaszáma megegyezett, de több mint kettő (látszólagos amplifikáció, ahol a kromoszóma

sokszorozódása vonja maga után a lokusz amplifikációját), iii.) *kismértékű amplifikáció*: a gén kópiaszáma maximum ötszöröse volt a centroméra szignálszámának, de nem haladta meg a sejtenkénti tíz kópiát, iv.) *nagymértékű amplifikáció*: az EGFR szignálszáma több mint ötszöröse a centroméra szignál számának és meghaladta a sejtenkénti tíz kópiát a sejtek több mint 10%-ában. Az EGFR génindexet az alábbiak alapján határoztuk meg: összes fluoreszcens szignál száma / a FISH-el értékelt sejtmagok száma.

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

FISH eredmények statisztikai analízise

Az egyes melanoma altípusok és a génkópiaszám eltérések (EGFR génindex) közötti összefüggést két-mintás Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) teszt segítségével elemeztük. A különböző altípusba tartozó minták között EGFR kópiaszám eltérések és EGFR/c7 arány összehasonlításához a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük.

Microarray alapú génexpressziós analízis

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

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

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

Microarray adatok statisztikai elemzése

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

A normalizációs lépések után a hibridizáció minőségét ellenőriztük, ez az úgynevezett „quality control”. A chipen lévő 47400 transzkript közül csak azokat vettük figyelembe, amelyekhez a tumor minták megfelelően hibridizáltak. A program az egyes array elemekben, „spot”-okban található megfelelő („match”) és nem megfelelő („mismatch”) próbapárok intenzitási értékéből a háttér érték korrekciójával számol egy valószínűségi értéket, amely alapján értékeli a hibridizáció sikerességét az adott spot-hoz. Az analízis során csak azokat a géneket vettük figyelembe, amelyek a 43 mintából 22-ben jelen („present”) illetve megfelelő („marginal”) indexel szerepeltek. A további statisztikai analíziseket az ily módon szűrt, 25886 transzkriptet tartalmazó génlistán végeztük el.

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

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

Jelátviteli útvonal analízis

Az analízist a daganatok felszínének kifekélyesedésével összefüggő szignifikáns eltérést mutató gének csoportján (1095) végeztük el. A génlistákban szereplő gének funkcionális szerepét az „Ingenuity Pathways Analysis software (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) és Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery

(DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>)” programokkal elemeztük. Ezekkel a programmal lehetővé válik a gének különböző jelátviteli útvonalakban való részvételének és kölcsönhatásának azonosítása.

Taqman Low Density Array (TLDA)

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

Array-CGH (aCGH)

Az array-CGH vizsgálatokat a teljes humán genomot lefedő 2460 BAC (*bacterial artificial chromosome*: mesterséges bakteriális kromoszóma) klónt tartalmazó króm-bevonatú lemezen végeztük a Kaliforniai Egyetem Comprehensive Cancer Center intézetével együttműködésben (*University of California, San Francisco, USA*). A BAC-alapú array kísérletek kivitelezéséhez a primer tumorokból DNS-t preparáltunk Gspin Genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Sangdaewon-Dong, Korea) alkalmazásával. A DNS-ek koncentrációját és tisztaságát NanoDrop készülékkel határoztuk meg. Az array CGH adatok feldolgozása a SPOT 1.2 és SPROC 1.1.1 szoftvercsomaggal történt. A 0,25 (+ 3SD) értéknél nagyobb, illetve -0,25 (- 3SD) értéknél kisebb Log2 értékeket tekintettük kromoszómális többletnek, illetve hiánynak.

Az aCGH és génexpressziós adatok összehasonlítása

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

EGFR mutáció analízis

Az EGFR gén 19-es exonjának mutáció analízisét huszonkét primer melanoma DNS mintán végeztük el olvadás pont elemzéssel. A 19-es exon 170 bázispárnyi fragmentumát amplifikáltuk 2 μ L FastStart Mastermix (Roche, Germany), 4 μ M MgCl₂, 0,5 μ M forward primer (5'-TCTGGATCCCAGAAGGTGAG-3'), 0,5 μ M reverz primer (5'-CAGCTGCCAGACATGAGAAA-3'), 0,2 μ M 3'FL-jelölt hibridizációs próba (5'-GCA ACATCT CCGAAAGCCAA-3'FL) és 0,2 μ M 5' LC Red640- jelölt hibridizációs próba (5'-LCRed640-GGAAAT CCT CGATGTGAGTTTCTG C-3'pH), 2 μ L templát DNS (1 μ g) mix használatával. Az alkalmazott PCR ciklusok: inkubáció: 95°C 10 perc; denaturáció: 95°C 10 másodperc, olvadás: 60°C 10 másodperc, az F2-es csatornán jelgyűjtés: extenzió 72°C 8 másodperc, 55 ciklus.

Immunhisztokémia

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

A melanoma sejtek kimutatására melanoma specifikus CD63 monoklonális antitestet használtunk.

A metszeteket fixálás után először a FITC-el jelölt EGF receptor elleni (1:100) antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Mosás után 1%-os PBS-ben oldott BSA oldattal blokkoltuk és CD63 melanoma antigénre specifikus antitesttel 1:50 (Vector Laboratories, Inc., USA) inkubáltuk 1 órán keresztül 4°C-on, majd anti-egér-Cy5-IgG (1:100) jelöltük szobahőmérsékleten 60 percig. A jelölt metszeteket kétszer mostuk PBS-ben, száradás után a sejtmagokat DAPI-val jelöltük. Az EGFR fehérje expresszió mértékének megállapítására az irodalomban is használt kategóriákat alkalmaztuk: 0: nem volt festődés; 1+: részleges membránjelzés; 2+: gyenge teljes membránjelzés; 3+: intenzív komplett membránfestődés a sejtek > 10%-ában.

Áramlási citometria

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

A receptor fehérje mennyiségének mérését FACScan áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) végeztük.

Western blot analízis és immunprecipitáció

A sejtlizátumot a sejtek PBS-sel történő mosását követően lízis puffer felhasználásával készítettük. A lízis puffer a sejtek teljes feltárására alkalmas, mely a következő összetevőkből állt: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 Complete Mini (Roche, Mannheim, Germany) proteáz inhibitor koktél tableta/10 mL, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mM NaF. A lízis pufferrel való 10 perces jégen való inkubálást követően a sejtlizátumot centrifugáltuk. A vizsgálandó fehérjék molekuláris szintű kapcsolatának elemzéséhez immunprecipitációt alkalmaztunk, melynek során a sejtlizátumot 1 órán át 4 fokon a megfelelő antitestekkel inkubáltuk. ErbB1 ellen F4 (E3138, Sigma, Schnellendorf, Germany) antitestet alkalmaztunk. Az immunoprecipitált fehérjéket Sepharose 4B Fast Flow Protein G gyöngyök (Sigma) felhasználásával, további 1 órás inkubálással kötöttük meg majd SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel választottuk szét molekulatömegük alapján és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránhoz kötött ErbB1 molekulát elsődlegesen az F4, a foszforilált tirozint a PY99-sc7020 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antitestekkel jelöltük meg a gyártó javaslatának megfelelő hígítást alkalmazva. A jelölt molekulák detektálására peroxidázzal konjugált egér elleni IgG-t és a kemilumineszcencia kimutatására kifejlesztet gyorstesztet (enhanced chemiluminescence kit, Amersham, Freiburg, Germany) alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

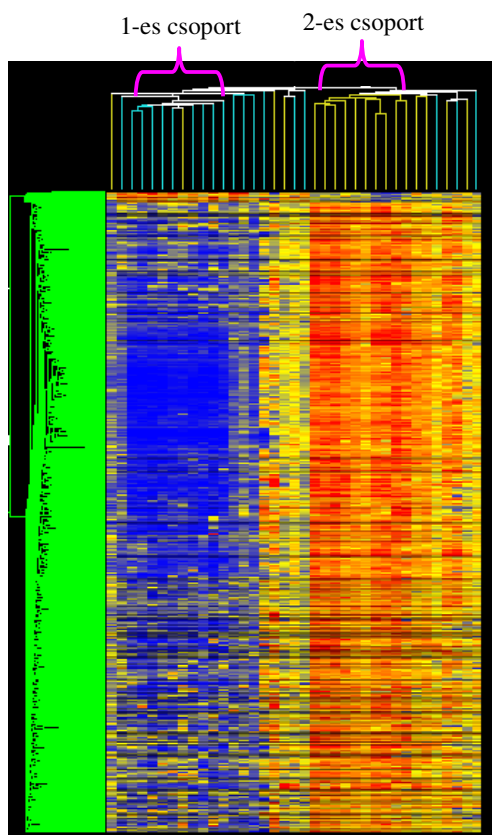
Malignus melanomák génexpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával

Kísérleteink során célunk volt primer melanomák és metasztázisok globális génexpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával, a génexpressziós változások és a daganatok klinikai viselkedése közötti kapcsolat elemzése. A kísérleteinkhez az Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-t használtuk, 43 tumor (37 primer melanoma, 6 metasztázis) génexpressziós mintázatát elemeztük. Az elemzéseinket a nyers fluoreszcencia intenzitási adatok többszörös normalizálása és minőségellenőrzése során kapott 25886 gént tartalmazó listán végeztük el.

A primer tumorokat klinikopatológiai tulajdonságaik alapján csoportokra osztottuk. Az egyes csoportokon belül az ún. „Volcano plot” elemzést alkalmaztuk, amely lehetőséget ad egy lépésben a minimum kétszeres expressziós különbséget mutató gének kimutatására úgy, hogy közben jelöli a szignifikáns mértékben eltérő expressziójú géneket is ($p < 0,05$, „Benjamini and Hochberg false discovery rate”). Az egyes klinikopatológiai csoportok között szignifikánsan eltérő expressziójú géneket a metasztázis képzés és a daganatok felszínének kifekélyesedése alapján képzett csoportoknál tudtunk kimutatni. A két listában szereplő gének 90%-ban megegyeztek egymással. Ennek magyarázata, hogy a microarray vizsgálatokban tanulmányozott 37 primer melanoma minta közül a 2 éves követési idő alatt 7 metasztázist képzett lézió egyben ulcerált felszínnel is rendelkezett. Így a továbbiakban az elemzéseinket az ulcerációval összefüggő génexpressziós változásokra fókuszáltuk.

Meglepő, hogy a rosszabb prognózisú ulcerált mintákban a gének nagyrésznél alulműködését figyeltük meg, ugyanakkor a gének megnövekedett expressziója jellemezte a jobb prognózisú mintákat. A jobb áttekinthetőség érdekében az 1095 transzkript mintánkénti expressziós mintázatát hierarchikus klaszter analízissel vizsgáltuk. Az 1-es ábra szemlélteti a primer melanomák és az 1095 gén klaszter analízisének végeredményét. A primer léziók a génexpressziós mintázat hasonlósága alapján két nagy klaszterbe csoportosultak. A bal oldali klaszterbe tartozó 20 minta közül 16 kifekélyesedő felszínű, a jobb oldali klaszterbe 14 nem ulcerált felszínű és 3 ulcerált felszínű minta tartozott. Rosszabb prognózisú mintákban az 1095 génből 1021-et a génexpresszió csökkenése jellemezte, míg ugyanezen gének megemelkedett génexpressziós szintjét figyeltük meg a jobb prognózisú mintákban. A rosszabb prognózisú csoportba tartozó mintákban, a legmagasabb intenzitási értéket az

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



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

Melanoma metasztázisok génexpressziós mintázata

Hat melanoma metasztázis génexpressziós mintázatát elemeztük microarray technikával. A metasztázisokat klaszter elemzéssel hasonlítottuk a primer melanomákhoz az ulcerációval összefüggő génlista alapján (1095 gén). Megfigyeltük, hogy a metasztázisok közül négy génexpressziós mintázata szoros kapcsolatban áll a rossz prognózisú primer melanomák mintázatával, mind a négy nyirokcsomó metasztázis. A négy metasztázisban, a primer léziókhöz hasonlóan, a vizsgált gének nagyrésze csökkent expressziós szinttel rendelkezett. A további két, kután metasztázis expressziós profilja a jobb prognózisú melanomák expressziós mintázatával mutat hasonlóságot. Az analízis eredménye alapján elmondhatjuk a rossz prognózissal jellemezhető primer melanomák génexpressziós mintázata hasonló a nyirokcsomó metasztázisok génexpressziós profiljához.

A gének funkcionális analízise

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

A fokozott expressziót mutató 74 génből a DAVID program a gének Affymetrix kódja alapján 67 gént azonosított, melyből 22 gén tartozik az ismert jelátviteli útvonalakhoz (KEGG). Az analizált gének többsége különböző receptor mediált jelátviteli folyamatokban játszik szerepet pl: JAK-STAT, TGF-béta és a Toll-like receptorok által szabályozott molekuláris hálózatokban. A citokin útvonalhoz a listából több gén is tartozik: CCL3L3, CCR1, EPOR.

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

Az 1021 alulműködő gént funkciójuk alapján az IPA program 26 molekuláris hálózatba rendezett. Az IPA adatbázisa az eddig ismert összes gén-gén kölcsönhatást, a gének jelátviteli és funkcionális folyamatokban betöltött szerepét tartalmazza, és ezen információk alapján alkot csoportokat a génlistában szereplő génekből. A különböző funkciók kialakításában, fenntartásában számos jelátviteli folyamat együttesen működik közre. A csoportokban szereplő gének a bőr- szőrfejlődésben, a sejtciklus, sejtosztódás, sejt-sejt interakció, a sejtmozgást szabályozó valamint a kardiovaszkuláris rendszer fejlődésében szerepet játszó útvonalakhoz tartozik, továbbá különböző metabolikus folyamatok résztvevői. A fent említett folyamatok közül a bőr- és szőrfejlődési funkció; sejt-és szervfejlődés, bőr- és szőrfejlődési funkció dermatológiai betegségek; daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek; génexpresszió, dermatológiai betegségek, folyamataiban résztvevő gének kölcsönhatását részletesen is tanulmányoztuk. Az IPA analízissel kimutattuk, hogy a gének többsége elsősorban a p53, Nf-kB, WNT/ β -catenin kaszkádhoz kapcsolódik. A hálózatban a CDKN2A, TP63, NFkB, gének játszanak központi szerepet. Az általunk vizsgált gének közül a fent említettekkel kapcsolatban lévő gének az ulcerált felszínű, rosszabb prognózisú daganatokban csökkent expressziós szinttel rendelkeznek, ugyanakkor megnövekedett expressziójuk jellemzi a jobb prognózisú daganatokat.

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

Array CGH adatok és a génexpressziós változások

Tizenegy primer és 2 melanoma metasztázisnál tudtuk összehasonlítani az aCGH és génexpressziós adatokat. A megemelkedett expressziós szinttel rendelkező gének közül az általunk használt CGH array csak a SULF-1 gént reprezentáló RP11-120N14 BAC klónt (8q13.2) tartalmazta. A SULF-1 génnél három, a rossz prognózisú csoportba tartozó mintában mutattunk ki a küszöbérték feletti ($\log_2 > 0,25$) $\log_2 = 0,3$ értékeket, azonban ez az érték kicsi ahhoz, hogy a kromoszómális szakasz egyértelmű többletét jelentse. Mivel a CGH sejtpopulációk DNS-ében található átlag kópiaszámról nyújt információt, a 8q13.2 szakasz eltéréseinek pontosabb vizsgálatához FISH szükséges.

A csökkent expressziójú gének többsége az egyes kromoszómán az 1p21-22.3, 1p36, 1q21 1q36 régiókon, továbbá a 6p21, 6q21-6q23 valamint a 10q, 11q, 15q22 szakaszokon lokalizálódik. Három mintában detektáltunk a vizsgált géneknél $\log_2 < -0,25$ intenzitási értéket. Az irodalomban a heterozigóta deléciónak megfelelő $\log_2 = -0,5$ értéket a egy mintában a LAMA3 gént kódoló 18q11.2 és a 7-es mintában a 15q22.2 (RORA) szakaszokon figyeltünk meg. A többi mintában nem tudtunk kimutatni a vizsgált szakaszokon DNS hiányt, a gének expresszió csökkenésének hátterében valószínű nem a kromoszómális szakasz vesztese áll.

Taqman Low Density Array (TLDA) analízis

A microarray eredményeinket 35 primer melanoma mintán qPCR alapú Taqman Low Density Array alkalmazásával ellenőriztük. Kísérleteink során a microarray analíziseink adataiból kiválasztott 65 gén, továbbá 29 az irodalomban már leírt, a melanoma progresszióval összefüggésbe hozható gént tartalmazó TLDA-n végeztük el, kontrollként gliceraldehid-3- foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és β -actin géneket alkalmaztunk. A qPCR eredmények jó korrelációt mutatnak a microarray adatokkal. QPCR-al 47 génnél figyeltünk meg az ulcerációval összefüggő minimum kétszeres expressziós változást, ez a változás 25 génnél volt szignifikáns mértékű. A két melanoma csoport között legnagyobb expressziós szintbeli változást az interleukin 8 gén esetében figyeltünk meg (119-szoros).

EGFR és 7-es kromoszóma eltéréseinek vizsgálata primer malignus melanomákban

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

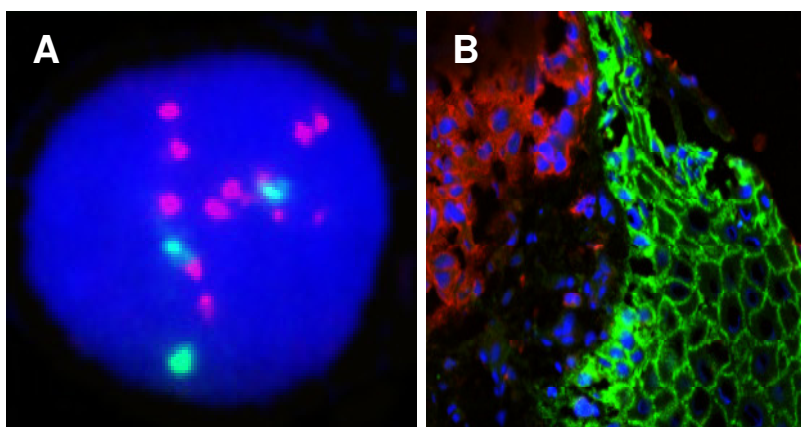
Kísérleteink másik szakaszában célunk volt a korábbi vizsgálataink során CGH-val kimutatott 7p12 többlet sejtszintű eltéréseinek vizsgálata, a 7p12-es lokuszon lokalizálódó EGFR génamplifikáció mértékének karakterizálása primer melanomákban, valamint a génamplifikáció és daganatprogresszió közötti kapcsolat elemzése.

A 7-es kromoszóma aneuszómiáját a léziók 70%-ában mutattuk ki. Az EGFR gén számbeli eltérését 64 (79%) lézióban figyeltük meg. Az EGFR gén index 1,0 és 8,9 között változott. A primer melanomák többségére a gén kismértékű amplifikációja volt jellemző. Tizenhárom melanomában detektáltunk nagymértékű amplifikációt, de ez az elváltozás csak hat tumornál érintette a sejtek több mint 10%-át. Az EGFR többlete a 7-es kromoszóma poliszómiájával társult ($p < 0,0001$). A gén amplifikációja mellett három mintában a gén delécióját is kimutattuk, mely a 7-es kromoszóma monoszómiájával asszociálódott.

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

Tizenhat FISH-el analizált melanoma mintánál az EGFR génkópiaszám eltéréseket génexpressziós adatokkal is össze tudtuk hasonlítani. Hét lézióban nem találtunk EGFR kópiaszám eltérést, ezen minták expressziós értékeinek átlagát választottuk viszonyítási értéknek (0,61; tartomány: 0,51 – 0,73). A további minták közül 5-öt kismértékű amplifikáció, 3-at látszólagos amplifikáció, és 1-et nagymértékű amplifikáció jellemzett. Ezen mintákból öt lézióban több mint kétszeres mRNS szintet mutattunk ki a 7 nem amplifikált mintához viszonyítva. Az egyik látszólagos amplifikációt hordozó mintában (7-es minta) több mint ötszörös mRNS szintet figyeltünk meg, ugyanakkor a léziót a receptor fehérje gyenge kifejeződése jellemezte. A 9-es mintában kismértékű amplifikációt és közepes fehérje expressziót detektáltunk. Az immunhisztológiai vizsgálatokra a FISH eredmények alapján látszólagos-, kismértékű és nagymértékű amplifikációt hordozó, valamint normál kópiaszámú és EGFR delécióval jellemezhető mintákat választottunk ki. Az EGFR fehérje kimutatására a fehérje extracelluláris részére specifikus direkt jelzett antitestet alkalmaztunk. Annak érdekében, hogy a mintákban a melanoma sejteket elkülönítsük a bőrben található egyéb

sejtektől CD63 melanoma antigénre specifikus monoklonális antitestet használtunk.



2. Ábra

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

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

A kontroll mintaként használt normál bőrben az epidermisz réteg keratinocitáinak erőteljes EGFR expresszióját, ugyanakkor a CD63 festődés teljes hiányát figyeltük meg. Ezzel szemben a tumor mintákban a melanoma sejteket erőteljes membrán és citoplazmatikus CD63 kötődés jellemezte. A léziókban az EGFR fehérje gyenge vagy expressziójának teljes hiánya volt megfigyelhető függetlenül a mintákban detektált EGFR kópiaszámtól és az mRNS expressziójának mértékétől. Kismértékű amplifikációt hordozó melanomákban gyenge illetve közepes mértékű fehérje expressziót figyeltünk meg. A számbeli eltérést nem tartalmazó melanomákban EGFR fehérjét nem tudtunk kimutatni. Nagymértékű amplifikáció nem társult fehérje expresszióval (2.ábra).

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

Klinikopatológiai paraméterek és az EGFR gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat vizsgálata

Betegek kora és neme: A melanomás betegek többsége az 50 évnél idősebb korosztályhoz tartozott. Ezekből a betegekből eltávolított daganatokban gyakrabban mutattunk ki EGFR gén többletet, de ez az eltérés nem volt szignifikáns az 50 évnél fiatalabb betegekből származó melanomákhoz képest. A férfiak és nők melanoma mintái között az EGFR átlagos kópiaszáma közel azonosnak adódott, bár kismértékű amplifikációt és deléciót nagyobb százalékban detektáltunk a férfi betegekből eltávolított melanomákban ($p = 0,05$).

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

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

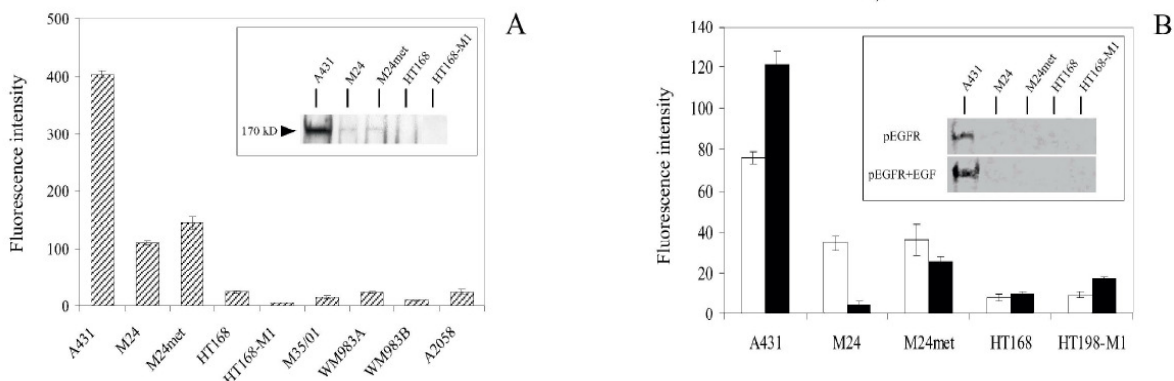
Metasztázis képzés és túlélés: Az EGFR kópiaszám index az 5 éven belül metasztázist képző daganatokban szignifikánsan magasabbnak adódott a nem metasztatizáló tumorokéhoz képest ($p=0,038$). Nagymértékű amplifikációt csak az áttétet képző melanomákban mutattunk ki. Ugyanakkor a gén többlet mellett 4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

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

A sporadikus melanoma minták FISH analízise mellett nyolc különböző metasztatikus tulajdonságú melanoma sejtvonalat elemeztünk EGFR és 7-es centroméra specifikus

próbával. Az *in vitro* rendszer vizsgálata lehetőséget ad a génkópiaszám és a fehérje kifejeződés mértékének meghatározásán túl, a receptor aktivációs állapotának megállapítására is. Mind a nyolc melanoma sejtvonalra jellemző volt a 7-es és az EGFR eltérések mintán belüli heterogenitása. A WM983A és HT168 sejtvonalakban az EGFR amplifikációt hordozó sejtek kis százaléka mellett nagyszámú diszómias sejtet figyeltünk meg. Kismértékű amplifikációt az összes sejtvonalban kimutattunk. Nagymértékű amplifikációt csak a M24met, WM983A és WM983B sejtvonalaknál detektáltunk, de ezen alterációt hordozó sejtek százalékos aránya nem haladta meg a 15 %-ot egyik mintánál sem.

Az EGF receptor fehérje extracelluláris részének mennyiségét áramlási citometriával és Western blot analízissel egyaránt vizsgáltuk. A kontroll A431-es epidermoid karcinóma sejtvonalat az EGF receptor fehérje magas expressziója jellemezte, ugyanakkor a melanoma sejtvonalakban a fehérje extracelluláris részének kifejeződését nem mutattuk ki. Egyedül az M24 és annak metasztázis párjában (M24met) detektáltuk a receptor fehérje gyenge expresszióját (3A. ábra). Az EGFR foszforilált tirozinkináz részének (pEGFR) mennyiségét EGF liganddal történő stimuláció előtt és után egyaránt tanulmányoztuk.



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

Az analizált sejtvonalak közül, függetlenül a 7-es kromoszóma és az EGFR gén kópiaszámától, egyedül csak az M24 sejtvonalban tudtuk kimutatni az EGFR intracelluláris tirozinkináz részének foszforilációját, melynek mennyisége ligand kezelés hatására nem változott (3B. ábra). Ezzel ellentétben a nagymértékű EGFR amplifikációt hordozó A431 kontrol sejtvonalban kétszer magasabb volt a pEGFR-el szintje stimuláció előtt az M24 sejtvonalhoz képest, ez a mennyiség ligandkezelés hatására szignifikáns mértékben megnövekedett (3B. ábra).

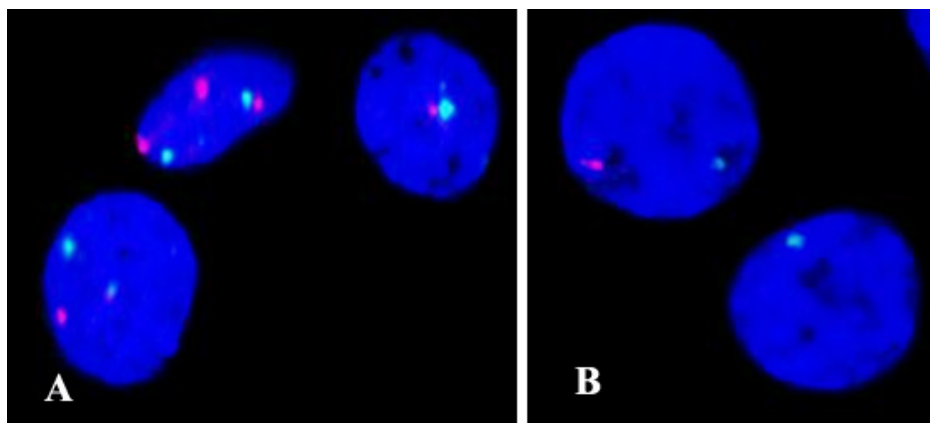
9p21 lokusz és a 9-es kromoszóma kópiaszám eltérései primer malignus melanomában

Kísérleteink célja a 9p21 régió kópiaszám eltéréseinek analízise interfázisos melanoma sejtekben fluoreszcencia *in situ* hibridizációval, valamint az eltérések és a daganatok klinikopatológiai tulajdonságai közötti kapcsolat vizsgálata. Nyolcvanegy primer melanomát analizáltunk 9p21 lokusz és 9-es centroméra specifikus próbákkal. A 9-es kromoszóma delécióját a korai és a késői stádiumú melanomákban egyaránt nagy százalékban kimutattuk. A 9-es kromoszóma vesztését a felszínesen terjedő (SSM) minták 44%-ában, míg a noduláris altípusba (NM) tartozó tumorok 24%-ában detektáltuk. A kromoszóma poliszómiáját 25 lézióban az analizált sejtek több mint 20%-ában figyeltük meg, ez az elváltozás 16 tumor esetében a sejtek több mint 50%-át érintette. Ezekben a tumorokban a poliszómiás sejtek mellett monoszómiás sejtpopuláció nem volt kimutatható. Egy lézióban több mint hat 9-es centroméra szignált találtunk a sejtek jelentős részében. A 9-es kromoszóma poliszómiája mindkét hisztológiai altípusban hasonló frekvenciával fordult elő (31%).

A 9p21 lokusz delécióját 67 melanomában (83%) mutattuk ki, mely 22 esetben a 9-es kromoszóma vesztésével társult (27%). Mindössze 7 minta hordozta a sejtek több mint 60%-ában a lokusz homozigóta delécióját. A régió legjellemzőbb eltérése a 9-es kromoszómához viszonyított relatív vesztése volt, melyet a minták 57%-ban detektáltunk. Tizennégy melanomában a 9p21 homozigóta delécióval jellemezhető sejtcsoportok mellett heterozigóta deléciót hordozó sejtpopulációk jelenlétét is megfigyeltük. Domináns homozigóta delécióval (a sejtek 63-86 %) és 9p21 többlettel rendelkező sejteket 5 tumornál figyeltünk meg. Kilenc melanománál a sejtek 40-76% százalékában 9p21-es extra kópiát detektáltunk ugyanakkor a sejtek kis hányadában a lokusz homozigóta delécióját is megfigyeltük. Hét lézióban nem tudtunk kimutatni 9p21-es lokuszt érintő eltérést FISH-el.

A 4. ábra szemlélteti a primer melanomákban FISH-el kimutatott jellegzetes 9p21-es eltéréseket. Az 4.A ábrán 3 különböző 9p21 számbeli eltérést hordozó sejt látható. Az egyik sejtben két 9-es kromoszóma szignált és egy 9p21 szignál látható ami heterozigóta deléciót jelent, a másik sejt egy 9p21 lokusz és egy 9-es kromoszóma specifikus jelet tartalmaz. A harmadik sejt a 9p21-es lokusz extra kópiaszáma jellemző. Az 4.B ábrán a 9p21 régió teljes hiányát, homozigóta delécióját szemlélteti.

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



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

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

A 9p21-es régió számbeli rendellenességei mellett, kíváncsiak voltunk arra is, hogy a lokusz kópiaszám eltérései milyen hatást gyakorolnak az itt lokalizálódó CDKN2A tumorsuppresszor gén expressziójára. Tizennyolc melanoma FISH-el és génexpressziós adatait tudtunk összehasonlítani. A kísérletekhez kvantitatív valós idejű PCR technikát alkalmaztunk, kontrollként naevus mintát használtunk. Négy mintában a CDKN2A gén kontrollhoz viszonyított több mint kétszeres expressziós szintjét mutattuk ki. Ezek közül három lézióban a sejtek több mint 65%-a hordozott 9p21 többletet. Kilenc melanománál a CDKN2A expressziójának csökkenését figyeltük meg, két tumorban a sejtek 71% valamint 91%-a 9p21 homozigóta deléciót hordozott. További három tumorban a sejtek 40-70%-ában a lokusz teljes hiányát figyeltük meg.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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