

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Humán malignus melanoma progressiójával társuló genetikai
eltérések analízise *in situ* hibridizációs módszerekkel**

ÁDÁM ZSUZSANNA

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

DEBRECEN, 2001

1. Bevezetés

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

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

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

A klasszikus citogenetika kromoszómasávozáson alapuló módszere a tumorban előforduló genetikai eltérésekről csak korlátozott információt szolgáltatott, ami elsősorban az *in vitro* sejtenyésztés technikai nehézségeivel hozható kapcsolatba. A 80-as évek végét követően egyre jelentősebbé váltak azok a molekuláris genetikai technikák, melyek segítségével a kromoszómális szintű genetikai eltérések megismerése a tumor sejtek *in vitro* tenyésztése nélkül is megvalósítható. Kiemelkedő jelentőségű ezek közül a technikák közül a fluoreszcencia *in situ* (FISH) és komparatív genomiális hibridizáció (CGH). A CGH előnye a tumorok teljes genomra kiterjedő gyors és átfogó genetikai analízisében ma már vitathatatlan, hiszen ezzel a módszerrel felismert genetikai elváltozások azokra a kromoszómális régiókra mutatnak rá, melyek specifikusak lehetnek egy adott daganat típusra, továbbá a tumor progresszió meghatározott stádiumára. Ezen specifikus kromoszóma szakaszok részletesebb analízise szükséges ahhoz, hogy az adott régióban elhelyezkedő géneket, melyek sokszor eddig ismeretlen onkogének vagy tumor szuppresszor gének lehetnek, felismerjük.

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

2. Célkitűzések

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

amelyek segítségével a melanoma prognózisa korábban megjósolható, és időben megfelelő terápia mellett dönthet a beteg kezelőorvosa.

5. A távoli szervekben létrejövő áttét tehető felelőssé a melanoma halálozás nagy részéért. Tanulmányomban sejtvonal modellen vizsgáltam a melanoma máj-metasztázis kialakulásához kapcsolódó genetikai eltéréseket.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Melanoma szövetminták

A primer melanoma tumorok és a melanoma metasztázisok, a FISH és CGH vizsgálathoz felhasznált friss szövetminták, a DE OEC Bőrgyógyászati Klinikájának műtéti anyagából származtak. A szövetmintákat OCT-be ágyazva -86 C° -on tároltuk. A diagnózis hematoxilin-eozin festéssel végzett szövettani vizsgálat alapján történt. A CGH analízishez csak azokat a szöveteket dolgoztuk fel, melyek tumorsejt tartalma meghaladta a 70%-ot. A mintákból a genomiális DNS preparálása standard módszerrel történt.

3.2. Sejtvonalak

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

- A2058 – egy 43 éves beteg agyi metasztázisából származó humán amelanotikus melanoma sejtvonal.
- HT168 – az A2058 xenograftként való in vivo adaptációjával kialakított HT168 tumorból kialakított sejtvonal.
- HT168-M1 – a HT168 sejtek immunszuppresszált egér lépébe ültetésével létrehozott sejtvonal.
- WM35 – benignus, nude egérben nem-tumorkeltő, korai (RGP) fázisú humán melanoma sejtvonal.

- M24 – nyirokcsomó metasztázisból izolált, nude egérben tumorkeltő humán melanoma sejtvonala.
- M24met – az M24 sejtek által nude egér nyirokcsomójában létrehozott metasztázisból kialakított agresszív viselkedésű sejtvonala.

3.3. Kísérleti melanoma máj-metasztázis modell

Az előzőekben ismertetett sejtvonalak közül három (A2058, HT168, HT168-M1) jellegzetessége, hogy egymással szoros kapcsolatban vannak. Az A2058 szülői sejtvonalból származott a HT168 sejtvonala, majd ennek utódjaként alakult ki az agresszív metasztatizáló hajlammal rendelkező HT168-M1 sejtvonala. A HT168-M1 sejtek máj-kolonizáló képessége extrém magas, immunszuppresszált egér lépébe injektálva több mint 250 metasztázist hozott létre. Ezzel ellentétben, az eredeti A2058 és az ebből származtatott HT168 sejtvonala ugyanazon kísérleti körülmények között nem, vagy csak kevés máj-metasztázist adott. A HT168-M1 megnövekedett máj-kolonizáló képessége nem járt együtt a sejtek *in vivo* vagy *in vitro* proliferatív kapacitásának fokozódásával.

3.4. Sejttenyésztés

A fenti sejtvonalakhoz tartozó sejteket 10% foetalis borjú szérumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban tenyésztettük (37 C°, 5% CO₂). A monolayer-ben növekvő sejteket 0.2%-os tripszin/EDTA oldattal kezeltük, és standard PBS oldattal mostuk. Ezt követően a sejteket két részre osztottuk, egyik részükből genomialis DNS-t preparáltunk CGH analízishez, a sejtek másik részét pedig FISH analízishez készítettük elő. A metafázis kromoszóma preparátumokat kromoszóma festő próbával történő

hibridizáláshoz standard protokollnak megfelelően készítettük és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.5. Komparatív genomiális hibridizáció

3.5.1. Hibridizáció

A DNS hibridizációt Kallioniemi és mtsai. által leírt módon végeztük, kisebb módosításokkal. A tumor és normál DNS-t fenol:kloroform:izoamilalkohol oldattal extraháltuk proteináz K kezelést követően, standard protokoll alapján. Normál DNS-t egészséges egyén perifériás mononukleáris sejtjeiből izoláltunk. A tumor és normál DNS-t nick-transzlációval direkt jelzett d-UTP-vel megjelöltük. A tumor DNS jelzése zölden fluoreszkáló dUTP-vel, a normál DNS jelzése pedig vörösen fluoreszkáló dUTP-vel történt. A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy a jelzett DNS fragmentumok hossza 300 és 2000 bázispár között legyen. A sejtmagokat DAPI-t tartalmazó anti-fade oldatban festettük. Egy negatív (különböző jelzésű normál-normál DNS) és egy pozitív kontrollt (citogenetikailag részletesen jellemzett MPE-600 emlőtumor sejtvonal) használtunk a CGH eredmények validitásának biztosítására.

3.5.2. Digitális képanalízis

A CGH hibridizáció értékelésére Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt számítógép-vezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert alkalmaztunk. A fluoreszcens képek rögzítése (mintánként 8-10 metafázis) monokróm CCD kamerával történt. Automatikus háttérkorrekciót követően megszerkesztettük a kromoszómák kariogramját a DAPI festés alapján. A kromoszómális eltérések meghatározása a zöld és

vörös fluoreszcencia intenzitások aránya alapján, automatikusan minden metafázisra vonatkoztatva külön-külön történt. Az egyes metafázisokra vonatkozó kromoszóma profilokat átlagolva az adott tumorra jellemző átlag eltérések térképét kaptuk meg. DNS többletként definiáltuk azokat az eltéréseket, melyeknél a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitásarány meghaladta az 1.15-öt. DNS vesztésnek definiáltuk azokat az eltéréseket, melyeknél ez az arány 0.85 alatti értéknek adódott. Az ún. diagnosztikai háttér értékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg. A centroméra közeli heterokromatin régiókat és az akrocentrikus kromoszómák rövid karját nem vettük figyelembe, mert ezek a szakaszok Cot-1 DNS-sel blokkolva voltak.

3.6. Fluoreszcencia in situ hibridizáció

3.6.1. DNS-próbák eredete, jelzése és detektálása

Kísérleteink során centroméra és lókuszt specifikus DNS-próbákat alkalmaztunk az 1-es, 6-os, 7-es, 8-as, 9-es, 10-es, 11-es, 12-es, 15-ös, 17-es és X kromoszómára, lókuszt specifikus DNS-próbát a 7p12-p13 régióra. A 4-es kromoszóma esetén teljes-kromoszóma-festő próbát alkalmaztunk. A DNS próbák módosítása direkt jelzett vagy indirekt jelzett nukleotidokkal, nick-transzlációval történt. A biotinnal módosított DNS-próbákat Texas-Red vagy fluoreszcein-avidinnel, a digoxigeninnel módosított DNS szondákat monoklonális antitestekkel (anti-digoxigenin-fluoreszcein vagy antidigoxigenin-rhodamin), indirekt immunfluoreszcenciával tettük láthatóvá.

3.6.2. Hibridizáció

A FISH-t az irodalomban leírt protokoll alapján végeztük el, kisebb módosításokkal. Röviden: a tárgylemezen rögzített, fixált sejtmagokat és kromoszóma preparátumokat denaturáló oldatban 75 C°-on 2.5-5 percig denaturáltuk, majd ezt követően a sejteket emelkedő koncentrációjú hideg etanol sorozatban dehidráltuk és levegőn megszárítottuk. Centroméra specifikus próbáknál a DNS-próbát és jelöletlen humán placentális DNS-t tartalmazó hibridizációs elegyet 73 C°-on 5 percig denaturáltuk és a szintén denaturált target DNS-hez adtuk. A hibridizáció 37 C°-n nedves kamrában történt egy éjszakán át. A nem kötődött DNS-próbákat mosással távolítottuk el. A hibridizálódott próbákat a korábban leírtak alapján detektáltuk.

3.7. Fluoreszcens mikroszkópia

A FISH-sel kapott eredményeket Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük 100× nagyítású (NA 1.3) olaj-immersiós objektívvel. A fluoreszcens képek rögzítésére a Metasystems által forgalmazott, FISH analízisre is alkalmas képanalizáló rendszert alkalmaztuk. Az értékeléshez az irodalomban leírt metodikát követtük: a sejtmagokban lévő fluoreszcens szignálok sejtenkénti száma alapján csoportosítottuk a sejteket, mintánként 100-200 sejtmagot analizáltunk. Minden hibridizációt kontroll hibridizációval egészítettünk ki, azaz egészséges egyénből származó perifériás limfocitákon is elvégeztük a hibridizációt. A 4-es kromoszóma festő próba esetében 60 metafázist értékeltünk ki.

3.8. DNS tartalom meghatározása áramlási citométerrel

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

3.9. Immunhisztokémia

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

3.10. Statisztikai analízis

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

4. Eredmények és következtetések

1. Három, különböző metasztatikus potenciállal rendelkező, sejtvonalat tanulmányoztunk CGH és FISH módszerekkel. CGH-val kapott eredményeink szerint a legtöbb eltérés az erősen metasztatizáló M24met-ben található, az eredeti sejtvonalban (M24) a genetikai eltérések száma kevesebbnek adódott. Feltűnően sok kromoszómális eltérést detektáltunk CGH-val az alacsony metasztatizáló képességgel jellemzett WM35 sejtvonalon. Interfázisos FISH-sel, centroméra specifikus próbákkal mind a három sejtvonalat aneuploidnak találtuk. Az utóbbi módszerrel a WM35-ben az adott kromoszómákra az aneuszómia aránya kisebb volt, mint a melanoma progresszió előrehaladottabb stádiumát képviselő M24 és M24met sejtvonalak esetében. A két módszerrel kapott eredményeink értelmezésénél figyelembe kell vennünk, hogy a CGH a sejtek DNS mennyiségének átlagos változását mutatja meg, és a DNS veszteségek és többletek értékelésénél az elváltozásokat egy átlagosan négy vagy több kópiát tartalmazó alapkészlethez viszonyítjuk. Részben ezzel magyarázható a CGH és FISH eredmények között megfigyelt diszkrepancia, de figyelembe kell továbbá vennünk azt is, hogy a CGH hibridizációnál a kromoszómák heterokromatin régiójáról nem kapunk információt. Eredményeink szerint a CGH alkalmas módszer a sejtpopulációkban kialakuló domináns eltérések kimutatására, azonban az 50% alatt jelenlévő aneuploid szubpopulációk felderítéséhez szükség van a FISH és CGH módszerek kombinálására. A FISH segítségével ellenőrizni és lókuszt specifikus próbákkal karakterizálni tudjuk a CGH-val talált elváltozásokat, és képesek vagyunk adott lókusztok előfordulásának abszolút számát meghatározni egyedi sejtek szintjén.

2. Interfázisos FISH analízissel tanulmányoztuk, hogy milyen szerepe van a kromoszóma vesztésnek malignus melanoma progressziójában. Kísérleteink során FISH-el egy, vagy egyszerre két kromoszóma sejtenkénti eloszlását vizsgáltuk egy férfi betegből származó közel diploid primer melanomán és annak hipodiploid bőr metasztázisán.

Eredményeink szerint a primer tumorban a leggyakoribb elváltozás az 1-es, 9-es, 10-es, 15-ös és 17-es kromoszómák elvesztése volt, amit a metasztázisban fokozottabb mértékben figyeltünk meg. A metasztázisban a monoszómiás sejtpopulációk aránya az 1-es, 9-es, 10-es, 12-es, 15-ös és 17-es kromoszómákra vonatkoztatva kétszer magasabb volt, mint a primer tumorban, mindezek azt jelzik, hogy a primer tumorban a hipodiploid sejtklónok meglétének komoly jelentősége lehet a tumor későbbi, agresszív viselkedésének előrejelzésében. Fontos megjegyeznünk, hogy a 9-es kromoszóma (melynek melanomában jelentős szerepet tulajdonítanak mind a tumor iniciációban mind a tumor progresszióban) már a primer tumorban is a sejtek 33%-ában csak egy kópiában volt jelen, a metasztázisban pedig gyakorlatilag már nem volt kimutatható.

Általánosan elfogadott nézet, hogy a strukturális kromoszómális elváltozások illetve teljes kromoszómavesztések a tumor fejlődés korai, vagy akár már az iniciációs, fázisában fellépnek, ezáltal a daganat egy átmeneti hipodiploid állapotba kerül, amire azonban kevés direkt kísérleti bizonyíték van, és az iniciáció során fellépő genetikai elváltozások vizsgálata igen nehéz. Primer melanomán és metasztázisán végzett interfázisos citogenetikai vizsgálatunk arra szolgáltat további bizonyítékot, hogy a különböző kromoszómák elvesztése nemcsak a tumor progressziójában játszanak szerepet, hanem az iniciációban is vesznek.

3. A malignus melanoma agresszív metasztatikus viselkedéséhez társuló genetikai eltérések felderítése céljából primer melanomák és melanoma metasztázisok CGH analízisét valósítottuk meg. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a primer melanomák és a melanoma metasztázisok genetikai elváltozásainak mintázata hasonló, de vannak bizonyos, csak a primerre vagy metasztázisra jellemző eltérések. Az eltérések átlagos száma 6.3 volt a primer melanomák és 7.8 a metasztázisok esetén. Mind a primer mind a metasztatikus tumorokban gyakori eltérésnek mutatkozott a 9p és 10q szakaszok DNS vesztése, valamint az 1q, 6p, 7q és 8q kromoszóma szakaszok DNS többlete. Ezek közül a DNS szakaszok közül a DNS többlet gyakorisága fokozódott a 7q kromoszóma-szakaszon metasztázisokban. Hasonló emelkedés volt megfigyelhető 9p és 9q régiók DNS vesztésére. Mind a primer tumorokban, mind a metasztázisokban kiemelt amplifikációt találtunk az 1p12-p21 és az 1p22-p31 régióban. Csak a primer tumorra jellemző kiemelt amplifikáció volt a 4q12-q13.1, a 7q21.3-qter és a 8q23-qter kromoszóma-szakaszokon. A 20q13-qter régió kiemelt amplifikációja csak metasztázisos tumorban fordult elő.

A CGH eredményeink egyértelműen demonstrálják a kromoszómális eltérések felhalmozódását a melanoma progressziója során. Azoknál az eseteknél, ahol a primer tumor sebészi eltávolításától számított egy éven belül metasztázist észleltek szignifikánsan több eltérés volt kimutatható a primer tumorokban, mint azon betegeknél, akik ezen idő alatt metasztázismentesek voltak. Megállapítottuk, hogy a genetikai aberrációk fokozatos akkumulációja összefügg, illetve arányos a melanoma agresszivitásának növekedésével. A metasztázisban hangsúlyozottabb eltérések valószínűleg a genetikailag heterogén primer tumor sejtjeinek egy részénél megjelenve azoknak a tumoros szóródás irányába ható szelekciós előnyt biztosítanak. Azok a kromoszóma régiók, melyek DNS kópiaszáma különbözik a primer

és metasztatikus léziókban, a melanoma metasztatikus progressiójában szerepet játszó fontos géneket tartalmazhatnak.

4. A melanomás betegek kezelésének eredményesebbé tételéhez elengedhetetlen a metasztázis genetikai kockázatának meghatározása. A vizsgált esetek egyik csoportját az áttétet-nem-adó primer tumorok képezték, a másik csoportba a diagnózis időpontjában már metasztázissal rendelkező primer tumorok valamint cutan és nyirokcsomó metasztázisok tartoztak. Ez a megközelítés a tumoros heterogenitás befolyásának csökkentésével megkönnyíti a metasztatikus fenotípus háttérben álló genetikai eltérések felismerését. A leggyakoribb eltérések a 6p és 8q kromoszóma karokon kimutatott DNS többlet az áttétet nem adó és a metasztatizáló tumorokban egyaránt gyakori volt. Ezt alapul véve feltételezhető, hogy a 6p és a 8q kromoszóma szakaszok a tumoros sejtek szaporodásában és invazivitásában is szerepet játszanak. A biológiai viselkedésen alapuló csoportosítással megjelenő genetikai különbségek közül kiemelkedően fontos a 7p és 7q kromoszóma régiók (illetve adott esetben a teljes 7-es kromoszóma) DNS többlete, ez a genetikai eltérés a metasztázist képző csoportban gyakrabban jelent meg. Megfigyeléseink összhangban vannak a 7-es kromoszóma amplifikáció és a melanoma agresszív fenotípusát kapcsolatba hozó elmélettel, és jól illeszkednek a 7-es kromoszóma-eltérésekhez más tumor típusokban társuló rossz prognózist jelentő képbe.

Megfigyeltük, hogy előrehaladott melanoma tumorokban a 9p és 10q régióban a DNS vesztes előfordulási gyakorisága a két csoportban eltért. A metasztázist képző tumor csoportban e két eltérés volt a leggyakoribb a deléciók között. Az irodalomban elfogadott, hogy a 9-es és 10-es kromoszóma vesztesége olyan korai genetikai eltérés, mely jelen van az

iniciációtól kezdve egészen a késői progressziós lépésekig. Ez azzal magyarázható, hogy több fontos tumor szuppresszor gén is jelen van ezeken a kromoszómákon, melyek alterációi a tumor fejlődésének különböző fázisaiban jelentkeznek.

Eredményeink alapján, javasoljuk a melanómában érzékeny prognosztikus faktornak tartott 9p kromoszóma karon megjelenő deléció mellett a 7-es kromoszómán kimutatható többlet és a 10q kromoszóma karral asszociálódott deléció melanoma prognosztikában genetikai markerként történő alkalmazását. A három metasztázis-asszociált genetikai marker együttes alkalmazása javíthat a tumor progresszió előrejelzésében, mivel a tapasztalatok szerint több marker együttes alkalmazása hatékonyabb predikciót biztosít.

5. A melanoma máj-metasztázis kialakulásához társuló genetikai eltérések leírását humán melanoma sejtvonal modellrendszeren tanulmányoztuk. A vizsgált sejtvonalakat különböző mértékű máj-metasztázist képző tulajdonságuk alapján választottuk. Az A2058 szülői sejtvonal xenograftként történő *in vivo* adaptációja vezetett a HT168 tumor, illetve abból a HT168 sejtvonal kialakításához, ezt követően a HT168 sejtek immunszuppresszált egér lépébe ültetése eredményezte az agresszív metasztatizáló hajlammal rendelkező HT168-M1 sejtvonalat, mely utóbbi máj-metasztázis-képző hajlama messze kiemelkedik a három közül.

A CGH analízissel kimutatott genetikai eltérések közül mindhárom sejtvonalban közös kromoszómális eltérésként jelentkezett az 5p, 6p22-pter, 8q21-qter és 13q DNS szakaszok többlete. A sejtvonalakban kimutatott közös eltérések szembetűnően jelzik az A2058, a HT168 és a HT168-M1 sejtvonalak között fennálló klonális kapcsolatot.

A DNS veszteségek közül a 4-es kromoszóma és a 9p21.3-pter és 10p kromoszóma szakaszok eltérése csak az agresszív metasztatizáló (HT168-M1) sejtvonalban volt jelen, jelezve ezen változások kiemelt szerepét a metasztázisképzés folyamatában. FISH analízissel, teljes kromoszómát festő próbával tovább tanulmányoztuk a 4-es kromoszómán CGH-val megfigyelt deléció jellegét. Megállapítottuk, hogy a sejtek jelentős hányada (89%) a 4-es kromoszóma egyik kópiáját elvesztette, a maradék populációban viszont a kromoszóma rövid karja jelen volt, de a hosszú kar deléciót szenvedett. A FISH eredmények nagyon jó összhangban vannak 4-es kromoszóma CGH profiljának mintázatával, a kvantitatív értékek jól tükrözik a két sejtpopuláció jelenlétét a sejtvonalban.

A melanoma-metasztázis sejtvonalakon FISH és CGH módszerekkel talált kromoszóma eltérések jó egyezést mutattak a korábbi citogenetikai vizsgálatok eredményeivel. Ugyanakkor az eddig kevesebb figyelmet kapott kromoszóma régiók is előtérbe kerültek az emelkedett metasztázisképző tulajdonságuk miatt. A 4-es kromoszóma-vesztés megjelenése a fokozottan metasztatikus sejtvonalban a régióban lévő tumor szuppresszor gének inaktivációjának lehet a következménye, s a melanoma agresszív viselkedésének kialakításában játszott szerepére hívhatja fel a figyelmet.

5. Összefoglalás

1. A betegekből származó melanoma szövetmintákon és sejtvonalakon végzett kísérleteink során alkalmazott CGH és FISH érzékeny és hatékony módszerek bizonyult a melanoma kromoszómális eltéréseinek kimutatásában.
2. Primer melanomán és metasztázisán interfázisos FISH módszerrel bizonyítottuk, hogy a kromoszómális deléciók nemcsak a tumor progresszióban, de a tumor iniciációjában is szerepet játszanak.
3. Megállapítottuk, hogy a genetikai aberrációk fokozatos akkumulációja együtt jár a melanoma agresszivitásának növekedésével. CGH adataink alapján a genetikailag heterogén primer tumor számos sejtpopulációja között a klonális szelekció eredményeként megjelenik a metasztatikus sejtklón.
4. A 7-es kromoszóma többlete a malignus melanomában rossz prognózissal társul, eredményeink szerint aneuploidiája vagy a kromoszómán lokalizálódó gének amplifikációja kapcsolatban állhat a fokozott metasztázisképző potenciállal.
5. Az agresszív, máj-metasztázist képző sejtvonalban a metasztázisképző hajlamhoz társuló genetikai eltérések közül eddig ismeretlen 4-es kromoszóma deléciója újabb fontos, az áttétképzéssel összefüggésbe hozható onko-szuppresszor gének jelenlétére hívhatja fel a figyelmet.

6. Megállapítottuk, hogy a 9-es és 10-es kromoszóma vagy ezeknek a kromoszómáknak bizonyos szakaszai a metasztatikus progresszió korai fázisában deletálódnak és ezek a genetikai eltérések a távoli metasztázisok kialakulásában is szerepet játszanak. A 6p és a 8q szakaszok amplifikációja későbbi eltérések és elsősorban a tumor növekedésében és az invázióban játszanak szerepet, a 7-es kromoszóma aberráció a metasztázis megjelenéséhez, a 4-es kromoszóma elvesztése pedig a távoli máj-metasztázis kialakulásához köthető. Ezeknek a kromoszómáknak az aberrációi így egy progressziós sort képviselnek.

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

Az értekezéshez felhasznált közlemények jegyzéke

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

IF: 1,759

Ádám Z., Ádány R., Ladányi A., Timár J., Balázs M. (2000) Liver metastatic ability of human melanoma cell line is associated with losses of chromosome 4, 9p21-pter and 10. *Clin Exp Metastasis*; 18(4):295-302.

IF: 2,000

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

IF: 2.843

Egyéb közlemények

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

IF: 3,562

Előadások és poszterek

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

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

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

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

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

Balázs M., **Ádám Zs.**, Ádány R. (1997): Malignus melanomák genetikai instabilitása és metasztatizáló képessége közötti összefüggések tanulmányozása molekuláris genetikai módszerekkel. Magyar

Onkológusok Társaságának XXII. Nemzetközi Kongresszusa, Budapest, November 10-12.

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

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

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

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

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

Ádány R., Petkó Z., **Ádám Zs.**, Balázs M., Juhász A., Répássy G., Balázs M. (1998): Genetic alterations detected by comparative genomic

hybridization (CGH) in laryngeal and hypopharyngeal cancers. 17th UICC International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brazília

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

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

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

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