

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**ELTÉRŐ BIOLÓGIAI VISELKEDÉSŰ HUMÁN MELANOMÁK
GENETIKAI JELLEMZÉSE *IN SITU* HIBRIDIZÁCIÓS
MÓDSZEREKKEL**

TRESZL ANDREA

Témavezető: Dr. Balázs Margit

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

DEBRECEN, 2004.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	4
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1.	A malignus melanoma	6
2.2.	A melanoma etiológiája és rizikófaktorai	7
2.3.	A melanoma klinikai altípusai	8
2.4.	A melanoma TNM-klasszifikációja	9
2.5.	Genetikai eltérések malignus melanomában	10
3.	CÉLKITŰZÉSEK	15
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
4.1.	Melanoma szövetminták	16
4.3.	Sejttenyésztés	18
4.4.	Fluoreszcencia in situ hibridizáció	18
4.4.1.	Kromoszóma- és gén-specifikus DNS-szondák	18
4.4.2.	FISH hibridizáció	19
4.4.3.	Fluoreszcens mikroszkópia	19
4.5.	Spektrális kariotipizálás (SKY-FISH)	20
4.6.	Komparatív genomális hibridizáció (CGH)	21
4.6.1.	Kromoszómális CGH	21
4.6.2.	Digitális képanalízis	22
4.6.3.	Array-CGH	22
4.7.	Statisztikai analízis	24
5.	EREDMÉNYEK	25
5.1.	A <i>c-myc</i> onkogén amplifikációjának vizsgálata noduláris és felszínen terjedő primer melanomákban és melanoma metasztázisokban	25
5.1.1.	Primer és metasztatikus melanomák klinikopatológiai jellemzői	25
5.1.2.	Centroméra kópiaszám változás primer melanomákban	25
5.1.3.	Centroméra kópiaszám változások primer-metasztázis tumorpárokban	28
5.1.4.	A 8-as kromoszóma és a <i>c-myc</i> gén kópiaszámának összehasonlítása melanoma altípusokban	30
5.1.5.	Interfázisos melanoma sejtek <i>c-myc</i> eltéréseinek összehasonlítása CGH adatokkal	31
5.1.6.	Klinikopatológiai paraméterek és a <i>c-myc</i> gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat vizsgálata	32
5.3.	Primer melanomák és melanoma metasztázisok cDNS alapú array-CGH vizsgálata	45
6.	MEGBESZÉLÉS	49
6.1.	A <i>c-myc</i> onkogén amplifikációjának vizsgálata noduláris és felszínen terjedő primer melanomákban és melanoma metasztázisokban	49
6.2.	Egy új melanoma sejtvonaltípus citogenetikai jellemzése	54
6.3.	Primer melanomák és melanoma metasztázisok cDNS alapú array-CGH vizsgálata	60
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	62
8.	IRODALOMJEGYZÉK	64

TARTALOMJEGYZÉK

9.	K Ö Z L E M É N Y E K J E G Y Z É K E	71
9.1.	Az értekezés alapjául szolgáló <i>in extenso</i> közlemények	71
9.2.	Egyéb <i>in extenso</i> közlemények és indézhető absztraktok	71
9.3.	Előadások és poszterek.....	72
10.	K Ö S Z Ö N E T N Y Í L V Á N Í T Á S	74
11.	M E L L É K L E T E K	75

1. BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések korai felismerése és az idejében történő beavatkozások jelentős mértékben növelik a beteg túlélésének és teljes gyógyulásának esélyeit. A daganatkutatás több mint egy évszázados múltra tekint vissza, és bár az utóbbi évtizedben a fejlődés látványosan felgyorsult és fontos felfedezések láttak napvilágot, melyek haszná ma már a klinikai gyakorlatban is megnyilvánul (pl. *erbB2*-pozitív invazív emlődaganatok kezelése), a metasztázisban szenvedő betegek jelentős része még mindig nem számíthat tartós gyógyulásra. Ez különösen vonatkozik a bőr legrosszindulatúbb elváltozására, a malignus melanomára, ahol minden erőfeszítés ellenére a metasztázisos betegek öt éves túlélése 50 % alatt marad. A melanoma agresszív viselkedésére jellemző, hogy a tumor igen korai stádiumában már megjelenhetnek áttétek, és akár egy 1 mm vastagságot alig elérő daganat rövid időn belül a beteg halálát okozhatja. A melanoma kialakulásában és progressziójában a daganatra prediszponáló gének alterációi mellett, kiemelten fontos szerepet játszanak a környezeti tényezők. A környezeti faktorok közül az ultraibolya sugárzás daganat indukáló hatására utal, hogy az elmúlt 10 évben a melanoma incidenciájának ugrásszerű növekedését elsősorban azokban az országokban figyelték meg, melyekben az elvékonyodott ózonréteg miatti káros UV sugárzás aránya jelentősen megnövekedett.

A melanoma kialakulásának és progressziójának klinikai, hisztopatológiai és biológiai aspektusai jól ismertek, de a folyamatban résztvevő molekuláris mechanizmusokkal és a metasztatikus szóródással összefüggésben álló genetikai markerekkel kapcsolatos tudásunk igen korlátozott. A melanoma progresszióját leíró modellek alapját hosszú ideig kizárólag metasztázisokból előállított *in vitro* sejtvonalak képezték, csak kis számú primer daganat eltéréseit elemezték. A legismertebb melanoma-specifikus géneket familiáris eredetű daganatok tanulmányozása során fedezték fel. A daganat kialakulásának többlépcsős folyamata számos gén alterációját foglalja magába, ugyanakkor a melanomára már az első lépéstől jellemző a kromoszómális instabilitás, a kromoszómák nagyfokú aneuploidiaja és a genetikai heterogenitás. A malignus melanoma klinikopatológiai szempontból több altípusra különíthető el, melyek eltérő biológiai viselkedéssel, és feltételezhetően eltérő genetikai markerekkel jellemezhetők. Ezeknek a genetikai markereknek a megismerése és klinikai paraméterekkel történő összehasonlítása alapvetően fontos nemcsak a prognózis felállításában, hanem a hatásos terápia megtervezésében is.

A daganatok kialakulásának és progressziójának háttérében álló genetikai eltérések megismerése éveken át a kromoszóma eltérések vizsgálatának klasszikus citogenetikán alapuló módszerére korlátozódott, melynek hátrányai közismertek. A 90-es évek elején jelentek meg azok az alternatív, nagyfelbontású módszerek, melyekkel a tumorgenom *in vitro* manipulálása nélkül lehetséges a kromoszómális eltérések kimutatása. Ezek közül kiemelkedő jelentőségű a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) és az összehasonlító genomiális hibridizáció (*comparative genomic hybridization*: CGH). FISH-sel interfázisos sejtekben szinte valamennyi kromoszómális eltérés (aneuszómia, transzlokáció, génamplifikáció és deléción) kimutatható. CGH-el a tumorgenom gyors és átfogó genetikai analízise valósítható meg, egyetlen kísérlet során a genetikai elváltozások sorozata deríthető fel azok előzetes ismerete nélkül. A CGH-el felismert eltérések azokra a kromoszómális régiókra irányíthatják a figyelmet, melyek egy adott daganattípusra, a daganatprogresszió egyes lépéseire lehetnek specifikusak. Ezek részletes megismerése hozzájárulhat a daganatprogresszió mechanizmusának molekuláris szintű megértéséhez.

Ph.D. értekezésemben a FISH és CGH módszerek klasszikus és legmodernebb módszertani megközelítéseit alkalmazva célom volt a humán malignus melanoma két eltérő biológiai viselkedésű altípusában kimutatható kromoszómális eltérések analízise, a *c-myc* onkogén amplifikáció mértékének meghatározása, az eltérések klinikopatológiai paramétereikkel történő korrelációs analízise, primer és metasztatikus melanoma tumorpárok genetikai eltéréseinek cDNS-alapú array elemzése, valamint egy felszínen terjedő melanomából származtatott új sejtvonal komplex genetikai vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A malignus melanoma

A melanociták a bőr neuroektodermális eredetű pigment-termelő sejtjei. Fejlődésük során a bőrbe vándorolnak és normális esetben a bőr bazális rétegének sejtjei között véletlenszerűen helyezkednek el. Elágazó dendrit-nyúlványaik segítségével kapcsolatot tartanak a bőr bazális és felszíni rétegének keratinocitái között. Minden melanocita pigment-tartalmú melanoszómakat küld dendrit-nyúlványain keresztül körülbelül 36 bazális vagy szuprabazális keratinocitának, melyek együttese az ún. epidermális melanin-egység. A keratinocitákba így eljuttatott melanin elnyeli és védi a bőrt a káros napsugárzástól. A melanociták proliferációját, pigment-termelését és a dendritek növekedését a szomszédos keratinociták szabályozzák (1).

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

független) növekedésre tesznek szert, immunhiányos egerekben tumor kialakulását idézik elő, továbbá mind betegekben, mind kísérleti állat modellekben nagyfokú metasztatizáló hajlammal rendelkeznek (1).

2.2. A melanoma etiológiája és rizikófaktorai

A melanoma malignum incidenciája a 70-es évek óta a világ valamennyi országában rohamosan növekszik (5), bár az utóbbi években, elsősorban Ausztráliában és a skandináv országokban, ennek megtorpanását tapasztalták, amit elsősorban az UV-sugárzás-elleni védelem fontosságának tudatosítása érdekében folytatott kampánynak tulajdonítanak (6). Az elmúlt néhány évtizedben a melanoma okozta mortalitás szintén emelkedést mutat a világos bőrű populációkban (7). Az emelkedő incidencia és mortalitás ellenére szerencsére a túlélési esélyek javultak, ami nem magyarázható a melanoma kezelésében bekövetkezett fejlődéssel – hiszen ezen a téren jelentős változás nem történt –, hanem elsősorban annak köszönhető, hogy a primer tumort gyakrabban ismerik fel korábbi stádiumban, amikor a gyógyulási esélyek még sokkal jobbak (7,8).

Napjainkig számos vizsgálat foglalkozott a melanoma kialakulására hajlamosító kockázati tényezők megismerésével. Ez utóbbiak közül a legfontosabb a nagyszámú melanocitás anyajegy ($n > 50$), vagy atípusos anyajegyek megléte, a familiáris melanoma előfordulása, a betegnél korábban már kialakult melanoma, a túlzott napozás (napégés), és a világos bőrtípus. A legfontosabb környezeti tényezőnek a napsugárzást tartják, azonban fontos megjegyezni, hogy pusztán UV-sugárzással csak speciális keresztezést követően előállított kísérleti állatokban, vagy igen nagy, a természetben nem előforduló dózisu UV-sugárzással lehet melanomát indukálni (9,10). A gyakoribb hám eredetű bőrdaganatokkal szemben, melyek kialakulásáért az UVA sugárzás tehető felelőssé, a melanoma kialakulása az intenzív UVB-expozíció következménye, ami elsősorban gyermekkorban éri az embert (11). Epidemiológiai vizsgálatok szerint a nagyszámú anyajeggyel rendelkező egyéneknek nagyobb esélyük van melanoma kialakulására. A klinikailag atípusos vagy „diszplasztikus” névuszok megléte tovább emeli a melanoma kialakulásának kockázatát, különösen, ha a családban már előfordult ilyen daganatos megbetegedés. További hajlamosító tényezők a világos bőr-, szem- és hajszín (7).

A malignus melanoma, összehasonlítva más daganatokkal, kiemelkedő metasztatizáló hajlammal rendelkezik. A daganat agresszív viselkedésére jellemző,

hogy sokszor a kisméretű tumorból is megindulhat a metasztázis képződésre hajlamos sejtek szóródása. A metasztázisképzés esélyére és ez el a daganat várható kórlefolására a prognosztikai faktorok alapján következtethetünk.

2001-ben látott napvilágot annak a 13 vezető melanoma központnak a véleménye, melyben azonos kritériumok figyelembevételével több mint 30000 azonos sebési elvek szerint ellátott, egyeztetett szövettani szempontok alapján értékelt, és megfelelő ideig követett melanomás beteg adatait elemezték. A vizsgálat eredményei értelmében a diagnóziskor áttét nélküli primer melanómák klinikopatológiai paraméterei közül a túlélést befolyásolja a beteg életkora, neme és a primer tumor lokalizációja. Tapasztalataik szerint a fiatalabb korosztályba tartozóknak és a nőknek jobbak a túlélési esélyei, mint a férfiaknak és az idősebb betegeknek. Érdekes megfigyelés, hogy a lokalizáció szempontjából a végtagokon elhelyezkedő daganatok a jobb prognózisú csoportba tartoznak. A tumorstagság és a daganatok kifelékesedése is kapcsolatot mutat, és azt jelzi, hogy a vastagsággal (Breslow vastagság) párhuzamosan nő az ulceráció valószínűsége is. Fontos prognosztikai paraméternek találták a tumorsejtekkel infiltrált nyirokcsomók számát és az infiltráció mértékét is. A fenti, a melanoma kórlefolását alapvetően befolyásoló paraméterek meghatározásán kívül a melanoma új stádiumbeosztására is javaslatot tettek (12).

2.3. A melanoma klinikai altípusai

Klinikai megjelenése és viselkedése alapján a melanómákat az alábbi négy csoportba osztjuk:

1. *felszínen terjedő* vagy *szuperficiális melanoma (superficial spreading melanoma: SSM)*, a melanómák leggyakoribb altípusa, a test bármely részén kialakulhat, de férfiaknál leggyakrabban a törzsön, nőknél az alsó végtagokon fordul elő. Az SSM gyakran már meglévő névusz talaján keletkező aszimmetrikus, változatos színű és szabálytalan szélű lézió.
2. *noduláris malignus melanoma (nodular malignant melanoma: NMM)*, a daganat második leggyakoribb és egyben legagresszívebb viselkedésű formája, mely egyúttal a melanoma legrosszindulatúbb altípusa. A noduláris melanoma többnyire épp bőrön megjelenő gyorsan növekvő csomó, mely vérzékeny, gyakran amelanotikus. Mivel a tumor pigmentáltsága lehet egyenletes, és széle nem feltétlenül szabálytalan,

könnyen összetéveszthető a bazálsejtes karcinómával, a szeborreás keratózissal, vagy akár jóindulatú anyajegyekkel.

3. *lentigo maligna melanoma (LMM)*, a melanomák harmadik altípusa, a napsugárzásnak kitett bőrfelületen, gyakran az arcon, általában idősebb korban jelentkezik. Az előző két altípustól eltérően, az LMM kialakulásában egyértelmű összefüggés található az UV-expozícióval. A daganat növekedése lassú, gyakran évekig az epidermiszre korlátozódik és a dermális invázió akár 10–15 év elteltével indul meg. Megjelenésében az SSM-hez áll közel.
4. *akrálisan lokalizált melanoma (ALM)*, a nem kaukázusi népességben előforduló leggyakoribb melanoma altípus. A korábbi elnevezéssel (*acrolentiginosus melanoma*) szemben ez az akrálisan lokalizált tumor nemcsak lentigo maligna melanoma lehet, hanem noduláris, illetve felszínen terjedő melanoma is. Általában a tenyéren és a talpon, vagy a köröm alatt, esetleg a genitális vagy az orális nyálkahártyán, pigmentált foltként jelenik meg. A noduláris melanoma mellett ez a típus a legagresszívebb lefolyású, mivel általában későn kerül felismerésre, és a helyzetéből fakadó gyakori traumák szintén kedveznek a metasztázis képződésnek.

2.4. A melanoma TNM-klassifikációja

A melanoma kimenetelét befolyásoló klinikai és patológiai paramétereket számos vizsgálatban tanulmányozták és az eredményeket figyelembe véve az *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) a melanoma biológiáját pontosabban leíró, az emlőrák analógiájára kialakított, tumor-nyirokcsomó-metasztázis (TNM) stádiumbesorolást hozott létre, melynek értelmében az őrszemnyirokcsomó-biopszia eredménye kritikus a melanoma prognózis felállításában (12).

A jelenlegi TNM-klassifikáció szerint a tumorok besorolásának fő szempontjai (*I. táblázat*): a) a tumor mm-ben megadott vastagsága (T1: < 1 mm, T2: 1–2 mm, T3: 2–4 mm, T4: > 4 mm) és a primer tumor kifizélyesedése (korábban nem szerepelt a besorolás kritériumai között) („T” klasszifikáció); b) a regionális nyirokcsomók érintettsége, ami statisztikai elemzések szerint a melanoma progressziója szempontjából a legfontosabb korai prediktor, ezért a nyirokcsomóstátusz patológiai felmérésére bevezették az érintett nyirokcsomók számának meghatározását, illetve az új osztályozás prognosztikailag elkülöníti a klinikailag felismerhető ("makrometasztázis") és a csak patológiai vizsgálattal

kimutatható áttéteket ("mikrometasztázis") („N” klasszifikáció); c) távoli áttétek megléte és azok lokalizációja („M” klasszifikáció).

1. táblázat A melanoma malignum TNM-klasszifikációja

„T” klasszifikáció	„N” klasszifikáció	„M” klasszifikáció
T1: ≤ 1,00 mm	N1: 1 regionális nyirokcsomó a: mikrometasztázis* b: makrometasztázis**	M1: távoli kután-, szubkután-, nyirokcsomó metasztázis
T2: 1,01 – 2,00 mm	N2: 2-3 regionális nyirokcsomó a: mikrometasztázis* b: makrometasztázis**	M2: tüdőmetasztázis
T3: 2,01 – 4,00 mm	N3: 4-nél több nyirokcsomó/ nyirokcsomó-érintettség nélkül	M3: egyéb belszervi metasztázis/ M1-M2 + emelkedett LDH-szint
T4: > 4,00 mm	N2c + nyirokcsomó- metasztázis	
a: kifekélyesedés nélkül b: kifekélyesedéssel		

* szentinel nyirokcsomó-biopsziával igazolt nyirokcsomóáttét (nem tapintható nyirokcsomó esetén)

** klinikailag észlelhető és szövettanilag igazolt áttét

2.5. Genetikai eltérések malignus melanomában

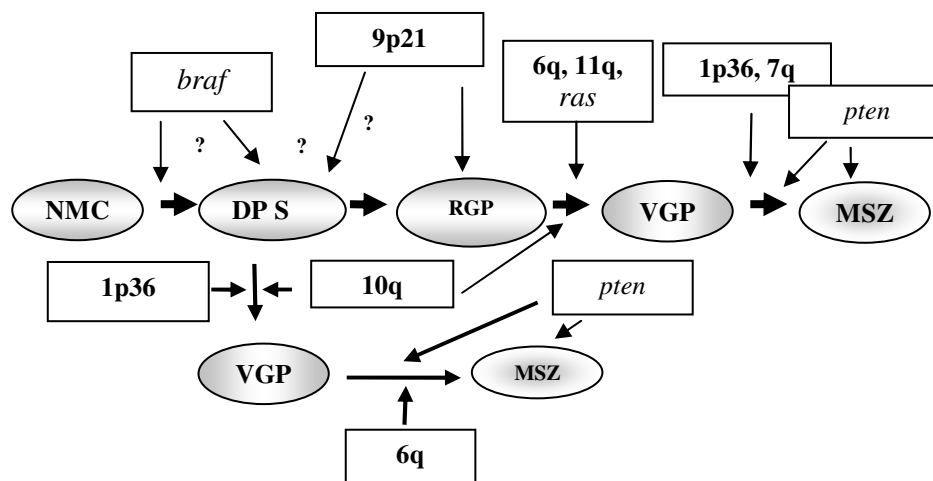
A melanomák mintegy 8-12% örökletes, a jelenleg elfogadott melanoma-progressziós modellek alapjául is családi halmazódást mutató esetek szolgálnak. Bár etiológiai, klinikai és hisztológiai szempontból a melanomákat a fentebb ismertetett négy alcsoportba soroljuk (SSM, NM, LMM, ALM), ezeket a melanoma genetikájával foglalkozó irodalomban eddig alig néhány közleményben különítették el, azonban a melanoma altípusok genetikai különbségeinek fontosságát ma már kezdik felismerni (13, 14).

A bőr melanomája a legagresszívebb humán daganatok közé tartozik, ha kezelését elhanyagolják, gyakorlatilag valamennyi melanoma képessé válik metasztázis(ok) kialakítására. Az előrehaladott vagy disszeminált tumorok adjuváns terápiát igényelnek, ez azonban, az intenzív kutatások ellenére, még mindig messze nem kielégítő, és a betegek jelentős többsége a metasztázis következtében hal meg.

A távoli szövetek sikeres kolonizálásához a metasztatikus sejtnak be kell jutni a véráramba, túl kell élnie a kiindulási helyéhez képest gyökeresen megváltozott körülményeket, és a megfelelő szövetben ki kell tapadnia, majd osztódnia kell. Ha a

daganatsejt ezen lépések bármelyikén nem képes túljutni, metasztázis nem jöhet létre. A még nem metasztatizált, de már minimális inváziós képességet mutató daganatok megállítására az egyetlen biztos mód olyan ágensek alkalmazása lehetne, melyek magukat a metasztatizálni képes sejteket eliminálják. Ahogy a legtöbb daganatnál, a melanománál sem áll egyelőre rendelkezésre ilyen terápia. Ennek oka, hogy a daganatprogresszió, különösen a nem-invazív-invazív határ átlépésének biológiai markereit még pontosan nem ismerjük.

A daganat keletkezésének pontos mechanizmusa máig tisztázatlan, annyi azonban bizonyos, hogy a tumor kiindulását képező sejt/sejtek örökítőanyagában olyan változások következnek be, melynek eredményeként a sejt elveszti kontrollját a sejtciklus szabályozása felett, megállíthatatlannak tűnő osztódásnak indul, miközben újabb-, és újabb mutációkat szerez, tovább növelve ezzel a genom instabilitását. Ez az instabilitás a legtöbb szolid tumorban mind kromoszómális-, mind génszinten megnyilvánul (15). Az *1. ábra* a melanoma kialakulásának és progressziójának különböző lépéseiben eddigi ismereteink szerint szerepet játszó kulcsfontosságú kromoszómális lókuszokat és géneket foglalja össze (14).



1. ábra Melanoma-progresszió modell. NMC: normál melanocita; DP S: feltételezett diszplasztikus prekursorsejt; RGP: radiális növekedési fázis; VGP: vertikális növekedési fázis; MSZ: metasztatikus szóródás.

A melanoma kialakulásával és inváziójával leggyakrabban az 1p, 6q, 7q, 10q és 11q kromoszómakarokon lokalizálódó, jórészt még azonosítatlan tumor-suppresszor és metasztázis-suppresszor (azaz a tumor keletkezést nem, de a metasztázis kialakulását

gátolni képes) géneket hozták összefüggésbe (16). Ezek közül eddig a 9p21 lókuszon elhelyezkedő *ink4a* (*cdkn2a*) ciklin-dependens-kináz inhibitor gén szerepe tűnik egyértelműnek mind sporadikus, mind familiáris melanómában. A 9p21 régió és a 10-es kromoszóma hosszú karjának elvesztése feltételezhetően a melanoma-progresszió korai szakaszában játszik szerepet (16). A radiális és vertikális növekedési fázis közötti átmenetben a 6q és a 11q karoknak tulajdonítanak jelentőséget, míg az 1p36 lókuszon megfigyelt deléció és a 7q karon észlelt amplifikáció a legutolsó szakaszra jellemző genetikai eltérés (16).

A melanoma-progresszió során bekövetkező genetikai változások Korai események

Normál sejtekben a CIKLIN-D1 fehérjével komplexet képző CDK4 és CDK6 fehérjék foszforilálják a retinoblasztóma fehérjét (pRB), ezáltal lehetővé teszik a sejt belépését az S-fázisba. A 9p21 kromoszóma régióan elhelyezkedő *ink4a* gén által kódolt p16^{INK4a} fehérje ehhez a komplexhez kötődik és inaktiválja azt, aminek eredményeként a sejt nem képes túljutni a G1 fázison és belépni a szintézis szakaszába. Ha a p16^{INK4a} fehérje hibás, vagy hiányzik, a sejt akkor is belép az S-fázisba, ha a sejt normál működéséhez szükséges javító mechanizmusok még nem fejeződtek be. A melanoma családi halmozódását mutató esetekben talált *cdkn2a* germinális mutáció – különösen az *ink4a* kódolásáért felelős exont érintő – egyértelmű bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a p16^{INK4a} fehérje fontos szerepet tölt be a melanoma szuppressziójában (17,18). A 9p21-es lókuszon, az *ink4a* génnel szoros kapcsolatban helyezkedik el egy másik tumor-szuppresszor gén is, az *arf* (p14) (mindkettőt a *cdkn2a* régió kódolja alternatív leolvasási keretben), mely szintén fontos szerepet játszhat a melanómák kialakulásában (19).

Számos daganatnál heterozigótaság-vesztés vizsgálatokkal (LOH) gyakran megfigyelték a 10q24-qtér lókuszt delécióját (20-22). A 10-es kromoszóma hosszúkarjának hiányát a sporadikus melanoma progressziójával hozták kapcsolatba (23, 24). Ezen a kromoszóma lókuszon található a *pten/mmac1* gén, melynek transzkripcióját a TGF- β downregulálja. Egy ilyen tenzin-homológ régió és foszfatáz domén kombináció, mint a PTEN/MMAC1, illetve ennek jelenléte a citoplazmában, olyan fehérjére utal, mely specifikusan képes az aktin filamentumokhoz kötődni a fokális adhéziós helyeken, és defoszforilálhatja az integrineket, a fokális adhéziós kinázokat, és a fokális adhéziós

komplexben jelen lévő SRC fehérjét, vagy növekedési faktor receptorokat, ezáltal szerepe lehet a sejt-növekedés, az invázió, az angiogenezis, és a metasztázis szabályozásában (25).

A melanoma kialakulásában a *braf* onkogén szerepére egyre több kísérletes adat létezik. A gén mutációit a melanomák és melanoma sejtvonalak 60-70%-ban sikerült kimutatni (26). A mutáció lehetséges szuppressziója siRNS-sel, valamint a RAF-útvonalat befolyásoló hatóanyagok felfedezésével a terápia új lehetőségét jelentheti.

A radiális és vertikális növekedési fázis közötti átmenetben szerepet játszó kromoszómális régiók

A 6-os kromoszóma hosszúkarjának deléciójáról gyakran számolnak be vastag primer melanomák és melanoma metasztázisok analízisét követően (27). Megfigyelték, hogy a kromoszómadefektust mutató, erősen tumorigén humán melanoma sejt vonal sejtjeibe normál 6-os kromoszómát bejuttatva a fenotípus drámaian megváltozik, a transzfektált melanomasejtekben helyreáll a kontakt-gátlás, és a sejtek nem képesek többé tumor létrehozására *nude* egérben (28). Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy a 6q21 régió lokalizálódik az *aim1* (*absent in melanoma 1*) gén, melynek teméke hasonló az aktin-kötő fehérjékhez, ami azt sugallja, hogy hatását a citoskeletonnal történő interakción keresztül érvényesíti (28). Ugyanennek a kromoszómának a rövidkarján található egy másik lehetséges metasztázis-szuppresszor gén, az *mda-6/waf1*, mely az univerzális CDK-inhibitor p21^{MDA6/WAF1} fehérjét kódolja. Az *mda-6* mRNS és fehérje expressziója számos tumornál fordított arányban áll a metasztatizáló képességgel (29).

A regionális és a már szóródott metasztatikus melanomáknak mintegy egyharmadában a 11q23-qter régió delécióját tapasztalták (30). Több kutatócsoport is kapcsolatot figyelt meg a 11-es kromoszóma hosszúkarjának átrendeződése és a melanoma rossz prognózisa, illetve a melanoma agyi metasztázis képzése között (31,32). Szintén a 11-es kromoszóma hosszúkarján található a *tirozináz* gén, melynek működése kritikus a melanociták normál funkciójához (33), így majdnem biztosra vehető, hogy részt vesz a melanoma progressziójában.

Az RGP-VGP átmenetben feltételezhetően ugyancsak szerepe van a *ras* onkogénnek, bár erre vonatkozóan ellentétes véleményekkel is találkozhatunk (34,35). A napsugárzásnak kitett bőrfelületen keletkezett lézióknál gyakran megfigyelték a *ras* onkogén mutációját, ami az ultraibolya sugárzás és a gén aberrációja közötti kapcsolatra

hívja fel a figyelmet (35). Ball és mtsai. invazív melanomák 38 %-ánál *ras* mutációt mutattak ki (36).

A progresszió késői fázisának genetikai történései

A melanoma genetika kutatásának korábbi szakaszában a legelterjedtebb technika a heterozigótaság-vesztés vizsgálat volt, így érthető, hogy a legtöbb eltérést delécióként tartjuk számon. Amplifikációra is akad azonban példa: a melanoma-progresszió késői eseményei közé sorolható a 7-es kromoszóma egészének, vagy bizonyos régióinak megtöbbszöröződése, ami az ezen a kromoszómán kódolt metasztázis kialakulást elősegítő gén jelenlétére utal (16,37). Ezen a kromoszómán található legismertebb onkogén az epidermális növekedési faktor-receptor (EGF-r) kódolásáért felelős gén, melynek szerepe melanomákban még nem pontosan tisztázott.

A melanoma kialakulásával és progressziójával elsőként kapcsolatba hozott kromoszómális régió az 1p36 volt (38), bár az ezt követő vizsgálatoknak nem minden esetben sikerült ezt alátámasztani. Fluoreszcencia *in situ* hibridizációval az 1q32-q41 lókuszra lokalizált *kiss-1* génről rendelkezésre álló adatok azonban már egyértelműbbek és arra utalnak, hogy egy melanomában fontos metasztázis-szuppresszor génnel állunk szemben (39).

Az eddig bemutatott útvonalak és gének a melanoma familiáris és sporadikus eseteinek csupán egy részében játszanak szerepet, jelezve, hogy további gének léteznek, melyek alapvető fontosságúak a melanoma kialakulásában és progressziójában.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A Ph.D. dolgozatot megalapozó kísérletes munka célkitűzései:

3.1. *Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák interfázisos FISH analízise kromoszóma centomérita- és c-myc gén-specifikus DNS szondákkal*

- Korábbi CGH eredményeinkre támaszkodva vizsgálataink elsődleges célja a primer és metasztatikus melanomák jelentős részében amplifikációt mutató 8q22-qter régióan lokalizálódó *c-myc* onkogén szerepének részletes vizsgálata felszínen terjedő és noduláris melanoma altípusokban és azok metasztázisaiban.
- Az aneuploidia, valamint a *c-myc* onkogén számbeli alterációi és a primer tumorok klinikopatológiai paraméterei közötti kapcsolat elemzése.

3.2. *Egy új, metasztázisképző humán melanoma sejtvonal eltéréseinek komplex genetikai analízise*

- Felszínen terjedő melanomából származtatott sejtvonal (M35/01) és a primer tumor genetikai aberrációinak összehasonlítása kromoszómális CGH-el.
- A sejtvonal számbeli és strukturális eltéréseinek részletes analízise különböző felbontású FISH módszerekkel és array-CGH technikával.

3.3. *Primer melanomák és melanoma metasztázisok cDNS alapú array vizsgálata*

- cDNS-alapú array vizsgálatok ugyanabból a betegből származó primer és metasztatikus tumorok genetikai eltéréseinek összehasonlítása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Melanoma szövettípusok

A dolgozatban szereplő humán melanoma szöveteket a Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum Bőrgyógyászati Klinikájáról és az Országos Onkológiai Intézet Bőrgyógyászati Klinikájáról (*Budapest*) szereztük be az intézetek etikai bizottságainak jóváhagyását követően. Minden betegnél biopsziával igazolt diagnózis állt rendelkezésre, melyet a DE OEC Bőrgyógyászati Klinika és az Országos Onkológiai Intézet szövettani laboratóriumaiban állapítottak meg. A betegek a primer tumor eltávolítása előtt, egy kivételtől eltekintve, nem kaptak sem kemoterápiát, sem sugárkezelést. A daganatok klinikopatológiai jellemzőit a **2. táblázat**ban foglaltuk össze.

2. táblázat *Primer melanomák klinikopatológiai paraméterei*

Noduláris melanomák

Minta száma	Nem	Kor	Lokalizáció	Breslow-vastagság	Clark szint	TNM-besorolás
1, 1m ^a	F	60	lábszár	1,50	IV	T2aN0M0
2, 2m	F	79	csípő	12,00	IV	T4bN0M0
3, 3m	F	39	hát	13,00	V	T4bN0M2
4, 4m	F	40	váll	3,00	III	T3aN0M0
5, 5m	N	62	has	40,00	V	T4bN2bM0
6	N	46	derék	8,00	IV	T4bN0M0
7	F	76	láb	4,00	V	T3bN0M0
8	F	58	mellkas	5,00	IV	T4bN0M0
9	F	68	törzs	8,00	IV	T4bN0M3
10	F	63	törzs	8,00	V	T4bN0M0
11	N	86	lábszár	6,20	III-IV	T4bN0M0
12	N	45	- ^b	7,50	II	T4bN0M0
13, 13m	N	23	fejbőr	10,00	IV	T4bN2bM0
14	F	73	kar	4,00	IV	T3bN0M0
15	F	73	mellkas	3,20	III	T3aN0M0
16	F	51	mellkas	14,00	IV	T4bN0M0
17	N	58	lábszár	6,10	IV	T4bN1aM0
18	F	80	hát	6,10	III	T4aN2aM0
19	N	40	kulcscsont	5,00	IV	T4bN?M3
20	F	49	-	4,70	IV	T4aN0M0
21	F	57	váll	4,70	III	T4bN0M0
22	F	32	arc	11,00	IV	T4?N0M0
23*	F	58	hát	9,00	IV	T4bN0M0
24	F	60	kar	11,00	IV	T4bN0M0
25	N	85	lábszár	4,00	IV	T3aN0M0
26	F	72	-	4,70	IV	T4aN0M0
27	N	52	térdhajlat	2,90	III	T3aN0M0
28	N	50	csukló	2,00	IV	T2aN0M0

a: metasztázis; az azonos számok ugyanarra a betegre utalnak.

b: nincs adat

**: a beteg a primer tumor eltávolítása előtt DTIC kezelést kapott*

2. táblázat *Primer melanomák klinikopatológiai paramétereit (folytatás)*

Felszínen terjedő melanomák

Minta száma	Nem	Kor	Lokalizáció	Breslow-vastagság	Clark szint	TNM-besorolás
29, 29m	N	70	lábszár	2,60	IV	T3bN0M0
30, 30m	F	43	has	4,00	IV	T3bN0M0
31, 31m	F	59	törzs	11,00	IV	T4bN0M0
32, 32m	N	24	lábujj	1,50	III	T2aN0M0
33, 33m	F	44	lábszár	12,00	IV	T4bN1aM0
34, 34m	F	58	lapocka	5,10	IV	T4bN3bM1
35	F	80	törzs	6,00	IV	T4aN0M0
36, 36m	F	54	has	6,00	IV	T4bN0M0
37	F	28	csípő	1,70	IV	T2bN0M0
38	F	60	törzs	2,50	IV	T3bN0M0
39	F	69	maxillaris régió	0,40	II	T2aN0M0
40	F	51	váll	1,95	IV	T2aN0M0
41	F	38	törzs	1,20	III	T2aN0M0
42	N	66	váll	2,70	IV	T3aN0M0
43	F	48	emlőbimbó	3,10	III	T3bN0M0
44	N	77	arc	1,30	III-IV	T2bN0M0
45	N	51	nyak	6,00	IV	T4bN0M0
46	F	39	törzs	4,00	IV	T3aN0M0
47	N	80	csukló	3,10	IV	T3bN0M0
48	N	54	hát	0,70	III	T1aN0M0
49	N	72	fej	6,00	V	T4bN0M0
50	N	49	hát	0,30	II	T1aN0M0
51, 51m	N	53	sarok	3,60	III	T3bN1bM0
52	F	55	hát	2,40	IV	T3bN0M0
53	N	69	talp	2,80	IV	T3bN0M0
54	N	68	láb	0,50	III	T1aN0M0

a: metasztázis; az azonos számok ugyanarra a betegre utalnak.

b: nincs adat

A tumorok stádium- és a vastagság-besorolását az új melanoma-TNM klasszifikáció alapján végeztük (12). Mivel az analizált melanomák jelentős részének eltávolítása 2002 előtt történt, amikor még nem számított alapkövetelménynek a daganathoz legközelebbi nyirokcsomó státuszának megállapítása, a tumorok egy részénél a TNM-osztályozás nem teljes, ezt a táblázatban jelöltük.

A melanoma szövetek többségét felhasználásig fagyasztófolyadékba (Cryomatrix, Shandon, PA, USA) ágyazva -86°C -on tároltuk; néhány esetben formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövet állt rendelkezésünkre. A friss vagy fagyasztott tumorokból lenyomat-preparátumokat vagy sejtszuspenziót készítettünk; a formalin fixált szövetekből standard protokoll alapján nyertük ki a sejteket (40). A hibridizációkhoz minden esetben egészséges donorból származó limfocita kontrollt használtunk. A limfocitákból rövid tenyésztés és

kolcemicid-kezelést követően az irodalomban ismertett protokoll alapján metafázisos és interfázisos magokat egyaránt tartalmazó preparátumokat készítettünk (41).

4.3. Sejtenyésztés

Az M35/01 sejtvonalat 10% magzati borjú szérumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban (*GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA*) tenyésztettük (37°C, 5% CO₂). Az egyrétegben növekvő sejteket 0,2%-os tripszin/EDTA oldattal kezeltük (0,53 mM, *Sigma Aldrich Co., Munich, Németország*), majd foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal (phosphate buffered saline: PBS) mostuk (pH: 7,2). Ezt követően a sejtek egy részéből DNS-t preparáltunk fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) extrakcióval CGH analízishez, a sejtek másik részét hipotóniás kezelést követően metanol:ecetsav 3:1 arányú keverékével fixáltuk FISH analízishez. A sejtvonalból standard protokoll alapján kromoszóma preparátumot készítettünk a kromoszómafestő szondákkal történő hibridizációhoz (41).

4.4. Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

4.4.1. Kromoszóma- és gén-specifikus DNS-szondák

FISH vizsgálatainkhoz centroméra-, lókuszcsoport-specifikus, valamint teljes kromoszómafestő DNS-szondákat alkalmaztunk. A centroméra-specifikus szondákat részben a Vysis (*Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA*) cégtől vásároltuk, részben magunk preparáltuk a Bari-i Egyetemtől kapott baktérium klónokból a V-gene (*V-gene Biotechnology Ltd., Hangzhou, Kína*), vagy a Qiagene (*Qiagen Inc., CA, USA*) plazmid-preparáló kitek segítségével. A c-myc (8q24.12-q24.13) lókuszcsoport-specifikus szondát a Vysis cégtől szereztük be. Az M35/01 sejtvonal karakterizálásához alkalmazott szondák (*Ip36, egr-1*) a Qbiogene (*Qbiogene GmbH, Heidelberg, Németország*), illetve a Vysis (*egf-r, cyclin-D1, 9p21, Rb1*) cégtől származtak. A különböző kromoszómák (2, 4-7, 11, 13, 15, 20-22), illetve a 6p21 régió-specifikus szondákat szintén a Qbiogene, vagy a Vysis cégektől szereztük be. A DNS-szondák jelzése direkt (SpectrumGreen dUTP és Fluorescein dUTP, TexasRed és SpectrumRed dUTP, *Vysis Inc.*), vagy indirekt jelzett nukleotidokkal (biotin-dUTP és digoxigenin-dUTP, *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország*) nick-transzlációval történt a gyártó cég leírásának megfelelően (*BioNick kit, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA*). A biotinnal módosított DNS-szondákat Texas

Red- vagy Fluoreszcein-avidinnel (*Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Nagy-Britannia*), a digoxigeninnel módosított DNS-szondákat monoklonális antitestekkel (anti-digoxigenin-fluoreszcein vagy antidigoxigenin-rhodamin, *Vector Laboratories Ltd.*), indirekt immun-fluoreszcenciával tettük láthatóvá az irodalomban leírtaknak megfelelően (24).

4.4.2. FISH hibridizáció

A FISH-t az irodalomban leírt protokoll alapján, kisebb módosítások alkalmazásával végeztük (24). Röviden: a tárgylemezen rögzített, fixált sejtmagokat és kromoszómapreparátumokat denaturáló oldatban (70 % formamid/2xSSC, pH: 7,0) 75°C-on 2,5-5 percig denaturáltuk, a sejteket emelkedő koncentrációjú (70 %, 85 %, 100 %) hideg etanolban dehidráltuk (2 perc külön-külön), majd levegőn megszáritottuk. A tumorszövetből készült lenyomat-preparátumokat a denaturáció előtt 3 percig 95°C-on 50 % glicerol/0,1 % SSC oldatban előkezeltük a DNS-szondák penetrációjának megkönnyítése érdekében. Centroméra-specifikus szondáknál a hibridizációs elegy mintánként 4-20 ng DNS-szondát és 10 ng jelöletlen hering sperma DNS-t, 10 % dextranszulfátot, 50 % formamidot és 2xSSC-t (*Sigma-Aldrich Co.*) tartalmazott. A hibridizációs keverék denaturálását 73°C-on 5 percig végeztük. A hibridizáció nedves kamrában 37°C-on történt egy éjszakán át. A nem kötődött DNS-szondák eltávolítására mosóoldatot (50 % formamid/2xSSC, 45°C, 3x10 perc), majd 2xSSC oldatot (10 perc) használtunk. A hibridizálódott szondákat a 4.4.3. részben leírtaknak megfelelően detektáltuk. A sejtmagok jelzésére antifade-ben oldott diamino-fenilindolt (DAPI, kék fluoreszcencia), vagy propidium-jodidot (PI, vörös fluoreszcencia) alkalmaztunk (*Vectashield, Vector Laboratories Ltd.*).

4.4.3. Fluoreszcens mikroszkópia

A FISH eredményeket Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal (*Carl Zeiss, Jena, Németország*) értékeltük (100 × nagyítás (NA 1.3) olaj-immériós objektív). A gerjesztő fény (fényforrás: 100 W teljesítményű higanygőz-lámpa) hullámhosszát megfelelő optikai szűrők alkalmazásával választottuk meg. Emissziós szűrőnek a Pinkel-féle hármas emissziós filterblokkot használtuk, ami alkalmas a kéken fluoreszkáló, sejtmagot jelző DAPI, a zölden fluoreszkáló fluoreszcein és SpectrumGreen, a vörösben fluoreszkáló

TexasRed és Spectrum Red, valamint az ugyancsak magfestést szolgáló vörösen fluoreszkáló propidium-jodid megjelenítésére. A fluoreszcens képek rögzítésére a Metasystems (*Metasystems GMBH, Althlusseim, Németország*) által forgalmazott képanalizáló rendszert alkalmaztuk. A fluoreszcens képek rögzítése automatikus expozíciós idővel történt. Minden esetben 100–300 sejtmagot, illetve a festő-szondák hibridizációját követően 20–25 metafázist értékeltünk. A hibridizáció megbízhatóságának ellenőrzésére kísérleteinkben kontrollként egészséges egyén perifériás véréből preparált limfocitákat alkalmaztuk. A tumorminták hibridizációját csak akkor értékeltük, ha a kontroll hibridizáció során a diploid sejtek aránya 95 %-nál magasabb volt.

Kromoszóma-index: A kromoszóma-indexet (összes fluoreszcens szignál száma/értékelt sejtmagok száma) tekintettük a kromoszóma kópiaszám kvantitatív mérőszámának. A kópiaszám kategóriák az adott mintában legnagyobb arányban (> 50 %), vagy jelentős arányban (20–50 %) megtalálható sejtpopulációt tükrözik (41). Egy adott mintát akkor tekintettünk poliszómiásnak, ha az értékelt sejtek több mint 15 %-ában több mint két autoszóma-specifikus szignál volt jelen; monoszómiásnak ha a sejtek több mint 10 %-a egy autoszóma-specifikus jelet tartalmazott.

Génamplifikáció: A kísérleteinkben vizsgált gének amplifikációjának mértékét Kraehn és mtsai. szerint definiáltuk. Abban az esetben tekintettük emelkedettnek a *c-myc* gén kópiaszámát a 8-as kromoszóma centromérához (C8) viszonyítva, ha az adott minta sejteinek >25 %-ában extra *c-myc* kópiát találtunk (42). A 8-as centromérához viszonyított *c-myc* extra kópia-tartomány kiszámításához az $x = \frac{c-myc \text{ szignálok száma}}{C8 \text{ szignálok száma}}$ (a vizsgált minta összes sejtjében) összefüggést alkalmaztuk. "Nem-amplifikáltak" azokat a mintákat tekintettük, ahol ez az arány < 1,5. Azokban a daganatokban, melyeket az "amplifikált" csoportba soroltunk, a *c-myc*/C8 arány elérte vagy meghaladta az 1,5-öt; nagyfokúnak tekintettük az amplifikációt, ha az előbbi arány meghaladta a 3,0-at.

4.5. Spektrális kariotipus analízis (SKY-FISH)

A spektrális kariotipizálást az irodalomban leírtak szerint a QBiogene Molecular Cytogenetics (*Németország*) közreműködésével végeztük: áramlási citométerrel szortírozott humán kromoszómákból polimeráz láncreakcióval előállított kromoszóma specifikus könyvtárak jelzése közvetlenül 5 különböző festékekkel (FITC, Rhodamine, Texas Red, Cy5 és Cy5.5) történt, majd mind a 24 kromoszóma-specifikus szondát egyidejűleg metafázisokhoz hibridizáltuk. A lemezek mosása után a DNS-tartalom megjelenítéséhez

antifade-ben oldott DAPI-t használtunk. A különböző spektrumok közötti elkülönítés SD300 spektrális bio-imaging rendszerrel valósult meg (*Applied Spectral Imaging Ltd, Migdal Ha'emeg, Izrael*). A rendszer Sagnac interferométer segítségével lehetővé teszi a teljes látható fény spektrum pixelenkénti mérését. A felvételeken a különböző spektrumoknál és a hasonló spektrális tulajdonságokkal bíró valamennyi pixelnél az átmeneti színek elkülönítésére klasszifikációs algoritmust használt. A DAPI kép rögzítése külön történt, a kromoszómák azonosításához a DAPI-sávozás szolgált alapul. A kromoszómákat ezt követően a rendszer automatikusan kariotípus táblázatba sorolta (43).

4.6. Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)

4.6.1. Kromoszómális CGH

A DNS hibridizációt Kallionemi és mtsai. (44) által leírt módon végeztük, kisebb módosításokkal, az alábbiak szerint. A tumorból és egészséges egyén perifériás mononukleáris sejteiből származó normál DNS-t fenol:kloroform:izo-amilalkohol (26:25:1) oldattal extraháltuk proteináz-K kezelést követően, standard protokoll alapján. A DNS minták koncentrációját fluoriméterrel határoztuk meg. A tumor és normál DNS-t nick-transzlációval, Spectrum Green-12-dUTP-vel, illetve Spectrum Red-5-dUTP-vel megjelöltük a gyártó (*Vysis Inc. Downers Grove, IL USA*) protokollja alapján. A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy a jelzett DNS fragmentumok hossza 300 és 2000 bázispár között legyen. A 200 ng jelzett tumor vagy normál DNS-t és 20 µg jelöletlen humán Cot-1 DNS-t (*GIBCO*) tartalmazó DNS keveréket 1 térfogat 0,3 M nátrium-acetáttal (pH: 5,3) és 100 %-os hideg etanollal kicsaptuk. A DNS-t levegőn megszáritottuk és 10 µl hibridizációs oldatban (50 % formamid, 10 % dextrán-szulfát, és 2xSSC (1xSSC 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-citrát, pH: 7.0)) feloldottuk. A hibridizációs elegyet 73°C-on 5 percig denaturáltuk, majd 37°C-on 30 percig állni hagytuk (preannealing lépés). A normál kromoszómákat tartalmazó CGH lemezeket (*Vysis Inc.*) 73°C-on 3-5 percig denaturáltuk, majd emelkedő koncentrációjú etanol sorban (70 %, 85 %, 100 %) dehidráltuk. A hibridizációs elegyet tárgylemezre cseppentettük és légmentesen lezártuk. A hibridizáció 37°C-on 72 órán át nedves kamrában történt. A hibridizációs lemezekről a nem hibridizálódott DNS-t hibridizáló-mosóoldat segítségével eltávolítottuk (50 % formamid, 2xSSC, pH: 7,0), majd kétszer 2xSSC-ben (pH: 7,0, 45°C), ezt követően egyszer 2xSSC-ben, és kétszer PN-pufferben (0,1 M Na₂HPO₄, 0,2 M Na₂HPO₄, Nonidet P40, pH: 8,0,

szobahőmérséklet, 10 perc) mostuk, majd a lemezeket ultratiszta vízben leöblítettük és levegőn megszáritottuk. A sejtmagokat antifade-oldatban (*Vysis Inc.*) oldott 0,15 $\mu\text{g/ml}$ DAPI-val festettük. A CGH eredmények validálásához negatív kontrollként különböző jelzésű normál-normál DNS-t, pozitív kontrollként SpectrumGreen-dUTP jelzett, az irodalomban elfogadott, részletesen jellemzett MPE-600 emlőtumor sejtvonalat és SpectrumRed jelzett normál DNS-t használtunk.

4.6.2. Digitális képanalízis

A CGH hibridizáció értékelésére Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóphoz (*Carl Zeiss, Jena, Németország*) kapcsolt számítógép-vezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert alkalmaztunk (*ISIS, Metasystems GmbH*). A fluoreszcens képek rögzítése (mintánként 8-10 metafázis) monokróm CCD kamerával történt (Compulog, IMAC-CCD-230, 8 bit felbontás, *Metasystems GmbH*). Minden metafázisról 3 fluoreszcens képet rögzítettünk: a kék fluoreszcencia a kromoszómák azonosítására szolgál (DAPI festés); a zöld fluoreszcencia a hibridizálódott tumor DNS-től, míg a piros fluoreszcencia a hibridizálódott normál DNS-től származik. Automatikus háttérkorrekciót követően a DAPI-sávozás alapján megszerkesztettük a kromoszómák kariogramját. A kromoszómális eltérések meghatározása a zöld és vörös fluoreszcencia intenzitások aránya alapján történt. Az egyes kromoszóma-profilokat átlagolva az adott tumorra jellemző átlag eltérések térképét kaptuk meg. Az irodalomban leírt definíció szerint DNS többletnek azokat az eltéréseket tekintettük, melyeknél a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitásarány $>1,15$; DNS vesztésnek pedig azokat, melyeknél ez az arány $<0,85$. Ezeket az ún. diagnosztikai határértékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg (44). Mivel a hibridizáció során használt Cot-1 DNS a kromoszómák centroméra közeli heterokromatin régióját blokkolja, ezeket a kromoszómaszakaszokat a CGH analízisben figyelmen kívül hagytuk.

4.6.3. Array-CGH

Az M35/01 sejtvonal array-CGH vizsgálatát a teljes humán genomot lefedő 2460 BAC (*bacterial artificial chromosome*: mesterséges bakteriális kromoszóma) klónt tartalmazó krómlemezen végeztük a Kaliforniai Egyetem Comprehensive Cancer Center intézetével együttműködésben (*University of California, San Fransisco, USA*). A többi

array-CGH kísérlethez 12300 cDNS elemet tartalmazó chipet használtunk, ez utóbbi kísérleteket a Biomedicum, Biochip Center intézetében (*Helsinki, Finnország*) végeztük el. A BAC- és a cDNS-alapú array kísérletek kivitelezése megegyezik, röviden: 1 µg teszt és referencia (*Promega, Madison, WI, USA*) genomiális DNS-t random-priming módszerrel a Bioprime Labeling Kit (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) segítségével Cy3 dUTP-vel vagy Cy5-dUTP-vel (*Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA*) megjelöltünk a gyártó használati útmutatóját követve. A be nem épült nukleotidokat a Qiagen QIAquick PCR Purification Kit-tel (*Qiagen, Valencia, CA, USA*) eltávolítottuk. A jelölt teszt és referencia DNS-eket Cot-1 DNS (*Roche, Indianapolis, IN, USA*) jelenlétében etanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t hibridizációs pufferben (50 % formamid, 10 % dextranszulfát, 2xSSC, 4 % SDS, és 10µg/µl élesztő tRNS) újra feloldottuk. A próbákat 72°C-on 10 percig denaturáltuk, majd 37°C-on 1 óráig inkubáltuk a jelölt DNS-ek jobb kötődése érdekében (preannealing). A hibridizációs keveréket az array-en 48 órán át 37°C-on hibridizáltuk. A lemezeket ezt követően 50 % formamid/2xSSC oldatban 45°C-on 15 percig, 2xSSC/0,1 % SDS oldatban 45°C-on 20 percig, végül 0,1 mol/L nátrium-foszfát puffer és 0,1 % Nonidet P-40 keverékében 10 percig mostuk. A BAC-array-eket DAPI-val jelöltük.

A BAC array-CGH felvételeket Cy3, Cy5 és DAPI szűrővel ellátott CCD kamerával rögzítettük. A kapott képek feldolgozása a SPOT 1.2 és SPROC 1.1.1 szoftvercsomaggal történt. A 0,5 értéknél nagyobb, illetve -0,5 értéknél kisebb Log₂ értékeket tekintettük kromoszómális többletnek, illetve hiánynak (45).

A cDNS array-CGH lemezeken a targetek fluoreszcencia intenzitását konfokális lézer szkennelrel rögzítettük és DEARRAY szoftver segítségével elemeztük (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*). A háttérkorrekció után minden elemre a teszt-DNS átlagintenzitását elosztottuk a megfelelő klón kontroll hibridizációs átlagintenzitásával. A génekópiaszám analízishez a kapott hányadosokat az array-en található összes target kalibrációs hányados-eloszlása alapján normalizáltuk. A gyenge minőségű hibridizációs jeleket (a 100 fluoreszcens egységnél kisebb referencia intenzitású kópiaszám adatok) az elemzésnél figyelmen kívül hagytuk, és ezeket hiányzó adatokként kezeltük. A kópiaszám emelkedés/csökkenés meghatározására a fluoreszcens hányadosok eloszlását használtuk. Az 1,2-nél nagyobb értékeket amplifikációnak, míg a 0,8-nél kisebb értékeket delécióknak tekintettük (46).

4.7. Statisztikai analízis

Az egyes melanoma altípusok közötti átlagos kromoszóma kópiaszám/sejt közötti eltérést a két-mintás Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) teszt segítségével elemeztük. A különböző altípusba tartozó minták közötti *c-myc* kópiaszám eltérések és *c-myc*/C8 arány összehasonlításához a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p=0,05$ alatti értékeket tekintettük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A *c-myc* onkogén amplifikációjának vizsgálata noduláris és felszínen terjedő primer melanomákban és melanoma metasztázisokban

Intézetünkben korábban végzett kromoszómális CGH vizsgálatok eredményei szerint primer melanomák közel 50 %-ában a 8-as kromoszóma eltérése 8q22-qtter amplifikációval társul. Mivel ezen a kromoszómaszakaszon lokalizálódik a *c-myc* onkogén, célunk volt a gén kópiaszám eloszlásának vizsgálata primer és metasztatikus melanomák interfázisos sejteiben. Ennek az eltérésnek a részletes tanulmányozását indokolta az is, hogy a *c-myc* gén amplifikációja számos tumortípusnál rossz prognózissal társul, melanomára vonatkozó irodalmi adat azonban alig áll rendelkezésre, a génamplifikáció mértékét kevesebb mint 10 primer tumornál írták le (42,47). A korábbi vizsgálatok elsősorban a MYC fehérje expresszióját tanulmányozták, és az eredmények ellentmondásos adatokat szolgáltatottak.

5.1.1. Primer és metasztatikus melanomák klinikopatológiai jellemzői

Vizsgálataink során 54 primer és 14 melanoma metasztázist analizáltunk FISH módszerrel. A daganatok klinikopatológiai adatait a **2. táblázatban** tüntettük fel. A noduláris melanoma (NM) altípusba 28, a felszínen terjedő melanoma (SSM) altípusba 26 primer tumor tartozott. A betegek életkor és nem szerinti megoszlása, valamint a primer tumorok lokalizációja a két alcsoportban hasonló volt. A daganatok vastagsága az NM altípusnál 1,5–40,0 mm, az SSM tumoroknál 0,3–12,0 mm között változott. A kifehélyesedett tumorok száma a két alcsoportban szintén hasonló volt. A két alcsoport között nem volt különbség a kialakult nyirokcsomó metasztázisok számában, azonban a noduláris melanomában szenvedő betegeknél közel kétszer több zsigeri metasztázis alakult ki a követési periódus alatt. Tizennégy betegnél a primer tumor metasztázis párja is rendelkezésre állt a genetikai vizsgálatokhoz.

5.1.2. Centroméra kópiaszám változások primer melanomákban

A daganatsejtekben a kromoszómák számbeli eltéréseit interfázisos FISH analízissel határoztuk meg. Vizsgálatainkhoz hét különböző centroméra specifikus szondát (1-es, 3-as, 6-os, 7-es, 8-as, 9-es és 10-es kromoszómák) alkalmaztunk. A 28 noduláris és 26 szuperficiális melanoma, valamint a 14 metasztázis FISH-eredményeit a **3. és 4. táblázatban** foglaltuk össze. Mindkét alcsoportban főként poliszómiás sejtpopulációkat találtunk. Megfigyeléseink szerint minden tumornál legkevesebb három kromoszóma

EREDMÉNYEK

jelentős számbeli eltérést mutatott, a 68 megvizsgált tumorból mindössze egy felszínen terjedő melanoma volt diszómiás.

3. táblázat A noduláris melanomák FISH adatainak összefoglalása

No.	Stádium ^a	Kromoszómák ^b								DNS-szondák átlagos sejtenkénti kópiaszáma			
		1	3	6	7	8	9	10	KI ^c	C8 ^d	<i>c-myc</i>	<i>c-mycl</i> C8 ^e	
1	T2aN0M0	m/p	p	p	p	p	m/p	m	2,8	2,2	3,5	1,6	
1m ^f		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>nd</i>	3,0	3,1	4,9	1,6	
2	T4bN0M0	p	p	p	p	p	m	m	3,2	2,2	6,8	3,1	
2m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	4,4	7,4	8,0	1,1	
3	T4bN0M2	p	p	p	p	p	m	m	2,9	4,0	4,6	1,1	
3m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	3,9	4,6	3,7	0,8	
4	T3aN0M0	p	nd	p	p	p	m/p	m	2,7	2,4	3,9	1,7	
4m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>m/p</i>	<i>m</i>	1,8	1,1	1,3	1,2	
5	T4bN2bM0	p	p	p	p	m/p	m	p	2,5	2,1	3,4	1,7	
5m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	2,9	1,2	1,4	1,2	
6	T4bN0M0	m/p	p	p	d	m	d	p	2,4	1,6	5,4	3,4	
7	T3bN0M0	p	p	p	p	p	p	p	3,6	5,7	7,7	1,4	
8	T4bN0M0	m/p	p	p	p	p	p	d	3,3	3,4	4,9	1,4	
9	T4bN0M3	p	p	p	p	p	d	m	3,4	3,7	3,9	1,1	
10	T4bN0M0	m/p	p	p	p	p	p	p	3,3	3,8	4,3	1,1	
11	T4bN0M0	p	p	p	p	p	p	p	3,5	3,5	6,5	1,9	
12	T4bN0M0	d	p	d	d	p	d	m	1,8	2,2	2,6	1,2	
13	T4bN2bM0	p	p	p	p	p	d	p	3,0	2,5	3,7	1,5	
13m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	3,2	2,7	4,0	1,5	
14	T3bN0M0	p	p	p	p	m	d	d	2,4	1,2	3,7	3,1	
15	T3aN0M0	p	p	d	d	p	m	d	2,3	2,4	4,3	1,8	
16	T4bN0M0	p	p	p	p	p	p	m	2,9	3,0	3,6	1,2	
17	T4bN1aM0	p	p	p	p	p	m/p	p	3,1	3,2	3,6	1,1	
18	T4aN2aM0	p	p	p	p	p	m/p	m	2,7	2,7	3,3	1,2	
19	T4bN? ^g M3	p	p	p	p	p	p	d	2,9	3,0	3,6	1,2	
20	T4aN0M0	m	d	p	d	m	m	m	1,7	1,9	2,0	1,1	
21	T4bN0M0	p	m/p	p	p	p	p	m	3,2	3,0	3,3	1,1	
22	T4?N0M0	p	m	p	d	d	m	m	2,0	2,0	2,1	1,1	
23	T4bN0M0	p	m/p	p	p	m	m	d	2,3	1,7	2,9	1,7	
24	T4bN0M0	p	m	p	p	p	p	m/p	3,1	3,5	3,7	1,1	
25	T3aN0M0	p	m	p	p	p	p	p	2,5	2,2	3,2	1,5	
26	T4aN0M0	m	p	p	d	d	d	m	1,9	2,0	2,1	1,1	
27	T3aN0M0	p	m	d	p	m/p	m	m	2,0	2,1	2,4	1,1	
28	T2aN0M0	p	m/p	p	d	p	m	m	2,1	2,3	2,6	1,2	

^a A TNM-klasszifikáció a jelenlegi *American Joint Committee on Cancer* szerinti stádium-beosztáson alapul.

^b m: monoszómiás-; d: diszómiás-; p: poliszómiás sejtpopuláció.

^c KI: kromoszóma-index (össz szignálszám/megszámolt sejtmagok száma).

^d C8: átlagos 8-as centroméra kópiaszám.

^e *c-myc*/C8 arány.

^f *m*: metasztázis; az azonos számok ugyanarra a betegre utalnak.

^g nincs adat.

4. táblázat *A felszínen terjedő melanomák FISH adatainak összefoglalása*

No.	Stádium ^a	Kromoszómák ^b								DNS-szondák átlagos sejtenkénti kópiaszáma		
		1	3	6	7	8	9	10	KI ^c	C8 ^d	<i>c-myc</i>	C8 ^e
29	T3bN0M0	p ^b	m	m	m/p	m	m/p	p	2,4	2,1	3,0	1,4
29m ^f		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>P</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>d</i>	3,2	2,1	2,8	1,3
30	T3bN0M0	m/p	p	m/p	d	m/p	m	d	2,3	2,9	3,3	1,1
30m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m/p</i>	3,6	4,8	3,9	0,8
31	T4bN0M0	m	d	d	d	m	m	p	2,1	1,8	2,0	1,1
31m		<i>m</i>	<i>d</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	2,6	1,1	2,4	2,2
32	T2aN0M0	m	m	d	d	p	m	m	2,1	2,7	3,2	1,2
32m		<i>m</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	2,0	0,7	1,9	2,5
33	T4bN1aM0	m	m	m	p	m	m	m	1,6	1,3	2,3	1,8
33m		<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m/p</i>	1,9	0,8	1,1	1,4
34	T4bN3bM1	m	p	p	p	m/p	m	m	2,2	2,1	2,1	1,0
34m		<i>m</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	2,5	1,4	1,6	1,1
35	T4aN0M0	p	m/p	m/p	p	d	p	p	2,4	2,1	2,7	1,3
36	T4bN0M0	p	p	p	p	p	m/p	d	4,3	5,2	5,6	1,1
36m		<i>m</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	2,3	3,7	2,7	1,3
37	T2bN0M0	p	p	p	p	p	m	m	2,0	2,1	2,4	1,1
38	T3bN0M0	p	m/p	m/p	p	m/p	p	d	2,4	4,4	4,6	1,1
39	T2aN0M0	d	p	p	p	m/p	m	p	2,4	2,2	3,1	1,4
40	T2aN0M0	p	p	p	p	p	p	p	4,1	3,1	4,4	1,4
41	T2aN0M0	p	m/p	m/p	p	p	m	d	2,9	3,5	4,4	1,3
42	T3aN0M0	p	m	m	p	d	m	m	2,2	2,0	2,2	1,1
43	T3bN0M0	d	d	d	p	m	m	m	1,8	1,9	2,4	1,2
44	T2bN0M0	d	nd	d	p	p	p	d	2,4	2,2	2,6	1,2
45	T4bN0M0	p	d	p	p	p	p	p	3,2	3,3	4,1	1,2
46	T3aN0M0	p	p	p	p	p	m	d	2,2	2,5	2,8	1,2
47	T3bN0M0	p	p	p	p	p	p	p	2,8	2,2	2,5	1,1
48	T1aN0M0	p	p	nd	p	m	p	d	2,3	2,0	5,1	1,3
49	T4bN0M0	p	m	m	d	p	p	m	3,5	4,6	2,2	1,1
50	T1aN0M0	d	m	m	p	m	m	d	2,0	2,0	2,2	1,1
51	T3bN1bM0	d	d	d	nd	d	d	d	2,3	2,0	3,0	1,1
51m		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	2,9	2,9	3,4	1,2
52	T3bN0M0	p	nd	nd	p	d	nd	nd	2,1	2,1	2,2	1,1
53	T3bN0M0	p	d	nd	p	p	m	m	2,3	2,5	3,8	1,5
54	T1aN0M0	d	d	nd	nd	d	d	d	2,0	2,0	2,0	1,0

^a A TNM-klasszifikáció a jelenlegi *American Joint Committee on Cancer* szerinti stádium-beosztáson alapul.

^b m: monoszómiás-; d: diszómiás-; p: poliszómiás sejtpopuláció.

^c KI: kromoszóma-index (össz szignálszám/megszámolt sejtmagok száma).

^d C8: átlagos 8-as centroméra kópiaszám.

^e *c-myc*/C8 arány.

^f *m*: metasztázis; az azonos számok ugyanarra a betegre utalnak.

^g nincs adat.

A noduláris alcsoportba tartozó valamennyi daganatban az összes vizsgált kromoszóma eltért a normál sejtekre jellemző kópiaszámtól. A táblázatokban az egyes kromoszómák domináns populációi mellett feltüntettük a kromoszóma-indexet (KI), a 8-as kromoszóma (C8) és a *c-myc* gén átlagos kópiaszámát, valamint a *c-myc* gén és a 8-as centroméra át-lagának arányát (*c-myc*/C8). A noduláris melanomákban a KI 1,9 és 3,6 között, míg a felszínen terjedő daganatokban ez az érték 1,6 és 4,3 között változott.

Az egyes altípusokra jellemző centroméra kópiaszámok összehasonlításának statisztikai elemzését követően kapott adatokat az **5. táblázat**ban foglaltuk össze. A noduláris altípusba tartozó tumoroknál a kromoszóma kópiaszám eltérése a daganatok 78–96 %-ában fordult elő, míg a felszínen terjedő melanomáknál a daganatok 56–92 %-át érintette. A 7-es kromoszóma kivételével a felszínen terjedő melanomákban jelentős számban találtunk monoszómiás sejteket. Az 1-es, 3-as, 6-os, 7-es és 8-as kromoszómák poliszómiája a noduláris altípusban gyakoribb volt. A 6-os kromoszóma poliszómiáját szignifikánsan több NM-ben mutattuk ki ($p=0,01$). Az egyik 9-es kromoszóma elvesztése a szuperficiális altípusnál kifejezettebb volt (SSM: 52 %; NM: 32 %), ugyanakkor a noduláris altípusban a 10-es kromoszóma egyik centromerájának delécióját figyeltünk meg gyakrabban (NM: 52 % és SSM: 28 %). A noduláris altípusba tartozó melanomák ploiditásának mértéke, amit a kromoszóma-index tükröz, kromoszómánként nagyobb volt, mint a felszínen terjedő csoportba tartozó lézióké (**6. táblázat**), azonban ez a különbség egyetlen kromoszómánál sem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket.

5.1.3. Centroméra kópiaszám változások primer-metasztázis tumorpárokban

A vizsgált kromoszómák többségénél a primer tumorokban és metasztázisaikban hasonló kópiaszám megoszlást figyeltünk meg, azonban a daganatprogresszió során bizonyos mértékű kópiaszám növekedést észleltünk (**3. és 4. táblázat**). Tizenegy melanoma metasztázisban a kromoszómák átlagos kópiaszáma (kromoszóma-index) nagyobb volt, mint az ugyanabból a betegből származó primer daganaté. Mindössze egy metasztázisnál (36m) figyeltünk meg több mint egy kromoszómánál deléciót, ezek az 1-es, 6-os, 9-es és a 10-es kromoszómákat érintették. A 9-es kromoszóma monoszómiáját, ami a primer tumorokban domináns eltérésnek számított, három beteg metasztázisában (29m, 30m és 32m) nem lehetett kimutatni.

5. táblázat

Kromoszómák számbeli megoszlása noduláris és szuperficiális melanomákban interfázisos FISH módszerrel

	No. ^a	Számbeli eltérések jelenléte ^b		Monoszómiás ^c		Poliszómiás ^d		Mono- és poliszómiás ^e	
		NM/SSM	NM (%)	SSM (%)	NM (%)	SSM (%)	NM (%)	SSM (%)	NM (%)
Chr 1	28/26	27 (96)	21 (81)	2 (7)	4 (15)	21 (75)	16 (62)	4 (14)	1 (4)
Chr 3	27/24	26 (96)	18 (75)	4 (15)	6 (25)	19 (70)	9 (38)	3 (11)	3 (13)
Chr 6 ^f	27/22	25 (92)	17 (77)	0 (0)	5 (23) ^f	25 (93)	8 (36) ^f	0 (0)	4 (18)
Chr 7	27/25	21 (78)	21 (84)	0 (0)	0 (0)	21 (78)	20 (80)	0 (0)	1 (4)
Chr 8	28/26	25 (89)	21 (81)	5 (18)	6 (23)	18 (64)	11 (42)	2 (7)	4 (15)
Chr 9	28/25	22 (79)	23 (92)	9 (32)	13 (52)	9 (32)	8 (32)	4 (14)	2 (8)
Chr 10	27/25	23 (85)	14 (56)	14 (52)	7 (28)	8 (41)	7 (28)	1 (4)	0 (0)

^a A vizsgált tumorok száma; NM: noduláris melanoma; SSM: felszínen terjedő melanoma.

^b Számbeli eltérést mutató tumorok száma.

^c Jelentős vagy domináns sejtpopuláció 0 vagy 1 szignállal.

^d Jelentős vagy domináns sejtpopuláció ≥ 3 sejtenkénti kópiával.

^e Mind monoszómiás, mind poliszómiás sejtek jelen voltak.

^f A Fisher-féle egzakt tesztet használva szignifikáns különbség volt kimutatható a két altípus között a 6-os kromoszóma esetén.

^g $p = 0,01$

^h $p = 0,01$

5.1.4. A 8-as kromoszóma és a *c-myc* gén kópiaszámának összehasonlítása melanoma altípusokban

A 8-as kromoszóma interfázisos FISH analízise a primer melanómák 85 %-ában (25 NM = 89 % és 21 SSM = 81 %), míg a melanoma metasztázisok 100 %-ában számbeli eltérést mutatott. A 8-as kromoszóma poliszómiáját a primer léziók 56 %-ában (19 NM = 68 % és 11 SSM = 42 %), a metasztázisok 79 %-ában detektáltuk (3. és 4. táblázat)

6. táblázat

A sejtenkénti átlagos kromoszóma kópiaszám és a c-myc gén kópiaszámának összehasonlítása FISH módszerrel noduláris és szuperficiális melanomákban

	n ^a NM/SSM ^b	SSM KI ^c ± SD	NM KI ± SD	p ^d
Chr 1	28/26	2,5 ± 0,7	2,7 ± 0,6	0,28
Chr 3	27/25	2,4 ± 0,7	2,5 ± 0,5	0,35
Chr 6	28/22	2,6 ± 1,2	2,7 ± 0,8	0,54
Chr 7	28/24	2,7 ± 0,8	3,2 ± 1,0	0,10
Chr 8	28/26	2,5 ± 1,0	2,7 ± 0,8	0,37
Chr 9	28/26	1,9 ± 0,6	2,1 ± 0,4	0,12
Chr 10	28/25	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,5	0,47
<i>c-myc</i>	28/25	2,8 ± 1,0	3,7 ± 1,3	0,02

^a Vizsgált tumorok száma.

^b NM: noduláris melanoma; SSM: felszínen terjedő melanoma.

^c KI: átlagos kromoszóma-index.

^d p-érték (a két altípus közötti kromoszóma és *c-myc* kópiaszám összehasonlítására Wilcoxon próbát alkalmaztunk).

A *c-myc* onkogén látszólagos amplifikációját (azaz sejtenként kettőnél több fluoreszcens szignált) három kivételével (20, 31 és 54) minden primer tumorban megfigyeltük. A két melanoma altípus sejtenkénti *c-myc* kópiaszámának összehasonlítására – az irodalomban is alkalmazott – $\geq 3,5$ gén kópiaszám/sejt küszöbértéket használtunk. Noduláris melanomáknál ez 2,0–7,7 között változott, a daganatok 61 %-ában 3,5 vagy annál nagyobb volt (2. táblázat). A felszínen terjedő melanómák mindössze 27 %-ában detektáltunk emelkedett *c-myc* kópiaszámot. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a sejtenkénti *c-myc* onkogén kópiaszámában a két altípus között: az NM altípusban a *c-myc* onkogén

kópiaszám emelkedése gyakoribb volt, mint a jobb prognózisú SSM altípusban ($p=0,02$) (6. táblázat).

A két melanoma altípusnál nemcsak a *c-myc* onkogén kópiaszámának átlagértéke volt eltérő, hanem a valódi génaamplifikáció mértékét jellemző *c-myc*/C8 arány emelkedés is, amit a noduláris melanomáknál gyakoribbnak találtunk ($p=0,01$). A daganatok többségét a mérsékelt fokú génaamplifikáció jellemezte ($c-myc$ /C8 <1,5). A $c-myc$ /C8 $\geq 1,5$ értéket a noduláris melanomák 36%-ában, a felszínen terjedő daganatok 8%-ában mutattunk ki. Nagymértékű *c-myc* génaamplifikációt csak a rosszabb prognózisú noduláris altípusban találtunk.

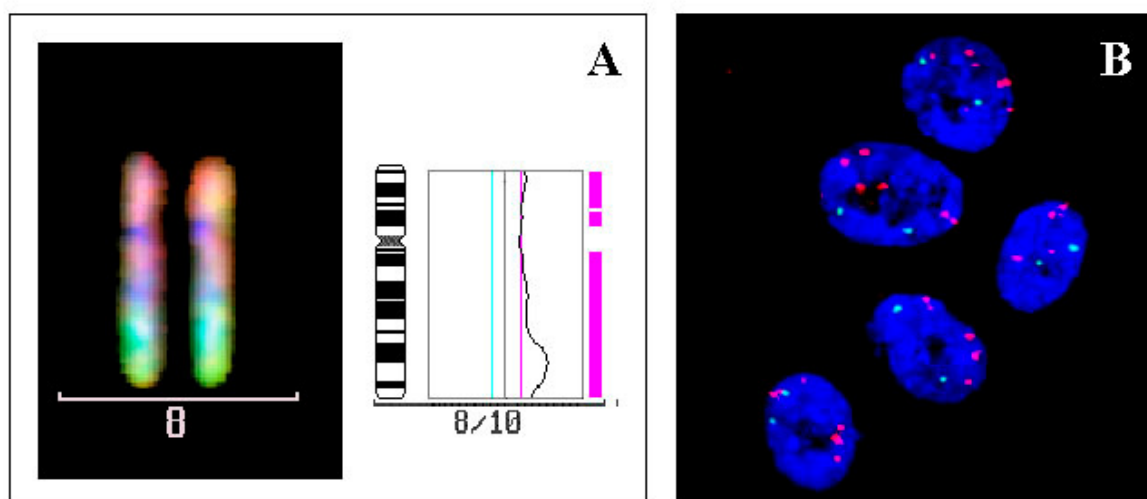
A metasztázisokban a *c-myc* amplifikáció mértéke 6 tumorban közel azonos volt az ugyanabból a betegből eltávolított primer tumor génaamplifikációjával. Ezekben a daganatokban az átlagos 8-as kromoszómaszám a metasztázisokban nagyobb volt, mint a primer tumorokban. Hat tumorpárnál a *c-myc* gén kópiaszám csökkenése együtt járt a 8-as kromoszóma elvesztésével is. A primer tumorhoz viszonyítva 7 metasztázisban (50%) a *c-myc*/C8 arány csökkent. A primer-metasztázis tumorpárok *c-myc* kópiaszám eloszlásának vizsgálata szerint a metasztázisok jelentős részében (8 a 14 tumorból) az átlagos sejtenkénti *c-myc* kópiaszám alacsonyabb volt, mint a primer szövetben, ez az érték 1,1 és 8,1 között változott. Az átlagos sejtenkénti *c-myc* kópiaszámhoz hasonlóan, emelkedett *c-myc*/C8 arányt is ritkán figyeltünk meg a metasztázisoknál. A 8-as kromoszóma centromérájához viszonyított *c-myc* kópiaszám növekedést csak 4 melanoma metasztázisban detektáltunk (1m, 13m, 31m és 32m). A *c-myc*/C8 arány relatív emelkedése két esetben (31m és 32m) a 8-as kromoszóma teljes vagy részleges elvesztésével társult. A primer tumorhoz viszonyítva 7 metasztázisnál (50%) a *c-myc*/C8 arány csökkent. A génaamplifikációnak ez az „eltűnése” nem tulajdonítható normál sejtek által okozott kontaminációnak, mivel a tumorok közül egyiket sem jellemezte normál eloszlás a különböző kromoszómákra, ami a szövetminták magas tumorsejt-tartalmát bizonyítja.

5.1.5. Interfázisos melanoma sejtek *c-myc* eltéréseinek összehasonlítása CGH adatokkal

Előzetes kromoszómális CGH vizsgálatainkban 8 primer melanoma (a CGH-el vizsgált tumorok 50%-a) és 5 metasztatikus lézió (a CGH-el vizsgált esetek 42%-a) a 8q kromoszóma régió DNS-többletet mutatott. Egy ilyen jellegzetes CGH profilt szemléltet a 2./A ábra. Annak megválaszolása, hogy a *c-myc* amplifikáció mellett milyen más közeli régiók lehetséges amplifikációja járul hozzá a gyakori 8q22-qter DNS többletkez, lókus-

specifikus szondák alkalmazásával lehetséges. A CGH-el analizált minták közül 8 melanománál a 8q22-qter régióra kapott CGH eredményeket interfázisos FISH adatokkal hasonlítottuk össze. Hat primer tumorban és 2 metasztázisban a 8q22-qter amplifikáció magában foglalta a *c-myc* onkogén amplifikációját.

A **2. ábra** egy noduláris melanoma (2. sz. minta) CGH-el felismert 8q22-qter amplifikációját mutatja; ugyanebből a daganatból származó interfázisos sejtekben a 8-as centroméra két kópiában, a *c-myc* onkogén 5–10 kópiában volt jelen. A *c-myc* onkogén (8q24.12–q24.13 régióra specifikus DNS-szonda) FISH vizsgálata mellett 6 tumornál (3 NM és 3 SS M) elegendő interfázisos minta állt rendelkezésre további hibridizációhoz. Ezekben a tumorlenyomat preparátumokon a FISH analízis eredményei egyértelműen azt mutatták, hogy a CGH-el megfigyelt DNS többlet *c-myc* amplifikációval társult; a 8q teloméra régiójára specifikus szondával nem találtunk extra kópiát egyik mintánál sem. A *c-myc* génre vonatkozó FISH-eredményeink jó összhangban vannak korábbi CGH-eredményeinkkel.



2. ábra 8q22-qter amplifikáció noduláris melanomában. A) CGH-el felismert 8q22-qter amplifikáció; B) Ugyabból a tumorból származó interfázisos sejtmagok FISH analízise 8-as kromoszóma- (zöld) és *c-myc* génspecifikus szondákkal.

5.1.6. Klinikopatológiai paraméterek és a *c-myc* gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat vizsgálata

A betegek, valamint a két különböző alcsoportba tartozó melanomák klinikopatológiai paraméterei és a *c-myc* onkogén eltérései közötti kapcsolatot vizsgálva az alábbiakat állapítottuk meg. A statisztikai analízis eredményeit a **7. táblázat**ban foglaltuk össze.

Betegek életkora. A primer tumorok *c-myc* alterációjának mértéke és a betegek életkora között nem találtunk összefüggést. A *c-myc* kópiaszám mindkét altípusban az 50

évesnél idősebb korcsoportban magasabb volt, mint az 50 évesnél fiatalabb korcsoportban, azonban a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

Daganatok lokalizációja. A végtagokon, illetve a törzsön vagy a fej-nyaki régión (axialis régió) lokalizálódó tumorok és az extra *c-myc* kópiával jellemezhető daganatok között nem találtunk összefüggést, azonban a *c-myc*/C8 arány a két alcsoportban jelentősen eltért: 22 olyan noduláris melanomából, mely a test axiális régióján alakult ki, nyolc tumornál (36 %) az arány $\geq 1,5$; a szuperficiális daganatoknál egyetlen lézió sem mutatott hasonló értéket. Szignifikánsan gyakoribb volt viszont a *c-myc*/C8 arány emelkedése a törzsön, illetve a fej-nyaki régió elhelyezkedő noduláris melanomák között ($p = 0,004$).

Daganat vastagsága. Nem találtunk különbséget a kisebb vastagság-kategóriába tartozó noduláris és szuperficiális alcsoport között (1,01–2,0 mm és 2,01–4,0 mm), sem az extra *c-myc* kópiaszám, sem a *c-myc* amplifikáció (*c-myc*/C8 $\geq 1,5$) elemzésekor. A nagyobb tumorvastagságú alcsoportban ($> 4,01$ mm) az extra *c-myc* kópiaszám közelítette a szignifikánsan eltérő mértéket, de azt nem érte el (átlagos *c-myc* kópiaszám/sejt $\geq 3,5$; $p = 0,08$). A *c-myc*/C8 arány elemzésekor a 4,01 mm-nél vastagabb melanomák két alcsoportja között szintén nem találtunk statisztikai különbséget. Fontos azonban megjegyezni, hogy az SSM csoportba tartozó két primer melanoma közül (33. és 53. sz. minták), melyeknél valódi génamplifikációt figyeltünk meg, az egyik tumor vastagsága 12 mm-nél nagyobb volt.

Primer tumorok felszínének kifeléyesedése. A *c-myc* gén számbeli eltérését mind ulcerált, mind ulcerációt nem mutató daganatoknál megfigyeltük. A noduláris melanomáknál az extra *c-myc* kópiát hordozó, kifeléyesedett tumorok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a felszínen terjedő daganatoknál ($p = 0,01$). A kifeléyesedett tumorok közül több emelkedett *c-myc*/C8 aránnyal jellemezhető daganat tartozott a noduláris altípusba, mint a szuperficiális altípusba, azonban a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (8. táblázat).

Metasztázis képződés. A nyirokcsomó metastázist képző noduláris melanomák közül szignifikánsan több tumornál találtunk emelkedett *c-myc* gén kópiaszámot, összehasonlítva az ugyanebbe a csoportba tartozó felszínen terjedő daganatokkal ($p = 0,04$); ez a különbség a *c-myc*/C8 kópiaszám arányra nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket ($p = 0,08$).

Betegek túlélése. Az emelkedett *c-myc*/C8 arány és a rövidebb, tünetmentes túlélési idő között szintén különbséget találtunk az NM és SSM altípusok között. A *c-myc* gén

kópiaszám eltérését jelentősen több noduláris melanománál figyeltük meg azoknál a betegeknek, akik a primer tumor eltávolítását követően 5 éven belül meghaltak ($p=0,02$).

7. táblázat A *c-myc* gén kópiaszám változásának összehasonlítása a betegek klinikopatológiai paramétereivel noduláris és szuperficiális melanomákban

	Átlagos <i>c-myc</i> kópia/sejt ≥ 3.5			<i>c-myc</i> /C8 ≥ 1.5		
	SSM ^a (%)	NM ^a (%)	<i>P</i>	SSM (%)	NM (%)	<i>P</i>
Összes tumor	7/26 (27)	17/28 (61)	0,02^b	2/26 (8)	11/28 (39)	0,01
Nem						
Nő	3/12 (25)	5/10 (50)	0,38	1/12 (8)	5/10 (50)	0,06
Férfi	4/14 (29)	12/18 (67)	0,13	1/14 (7)	6/18 (33)	0,20
Életkor (évek)						
20-50	1/8 (13)	5/9 (56)	0,13	1/8 (13)	3/9 (33)	0,58
> 50	6/18 (33)	12/19 (63)	0,13	1/8 (13)	8/19 (42)	0,20
Elhelyezkedés						
Végtagok	1/6 (17)	5/6 (83)	0,08	2/6 (33)	3/6 (50)	1,00
Axiális	6/20 (30)	12/22 (55)	0,13	0/20 (0)	8/22 (36)	0,004
Tumor vastagsága						
(mm)						
<1,0	2/4 (50)	0/0 (0)	-	0/4 (0)	0/0 (0)	-
1,01-2,0	1/6 (17)	1/2 (50)	0,46	0/6 (0)	1/2 (50)	-
2,01-4,0	2/9 (22)	3/6 (50)	0,33	1/9 (11)	4/6 (67)	0,09
>4,01	2/7 (29)	14/20 (70)	0,08	1/7 (14)	6/20 (30)	0,63
Ulceráció						
Nem volt	3/10 (30)	3/9 (33)	1,00	0/10 (0)	4/9 (44)	0,03
Volt	4/16 (25)	14/19 (74)	0,01	2/16 (13)	7/19 (37)	0,13
Metasztázis kialakulása						
Nem képzett metastázist	4/11 (36)	3/9 (33)	1,00	1/11 (9)	3/9 (33)	0,28
Nyirokcsomó metastázis	1/8 (13)	5/7 (71)	0,04	0/8 (0)	3/7 (43)	0,08
Visceralis metastázis	2/7 (29)	9/12 (75)	0,073	1/7 (14)	5/12 (42)	0,33
Exitus 5 éven belül^d	2/11 (18)	11/16 (69)	0,02	1/11 (9)	6/16 (38)	0,18

^a SSM: szuperficialisan terjedő melanoma; NM: noduláris melanoma.

^b Fisher egzakt teszt (kétoldalú *p*-értékek).

^c Metasztázis a primer tumor eltávolítását követő 5 éven belül kialakult.

^d Exitus a primer tumor eltávolítását követő 5 éven belül.

5.2. Egy új melanoma sejtvonal átfogó citogenetikai karakterizálása

Az új melanoma sejtvonalat egy 69 éves férfibeteg felszínen terjedő, vertikális növekedési fázisban lévő melanomájából Dr. Ladányi Andrea (*Országos Onkológiai Intézet, Tumorprogresszió Osztály, Budapest*) hozta létre 2001-ben, a sejtvonal elnevezése: M35/01. A betegben a primer tumor eltávolítását követően egy év múlva májmetasztázis alakult ki. Az RPMI 1640 médiumban tenyésztett sejtvonal több évig tartó folyamatos fenntartás után is megtartotta osztódóképességét. A melanoma sejtek immunszuppresszált (SCID) egerekbe történő subcutan ($1-3 \times 10^6$ sejt) beoltását követően metastázis nem alakult ki, azonban lépbe oltás (2×10^6 sejt) után májmetasztázis jött létre. Az M35/01 sejtek intraperitoneális oltását követően peritoneális szóródás volt megfigyelhető.

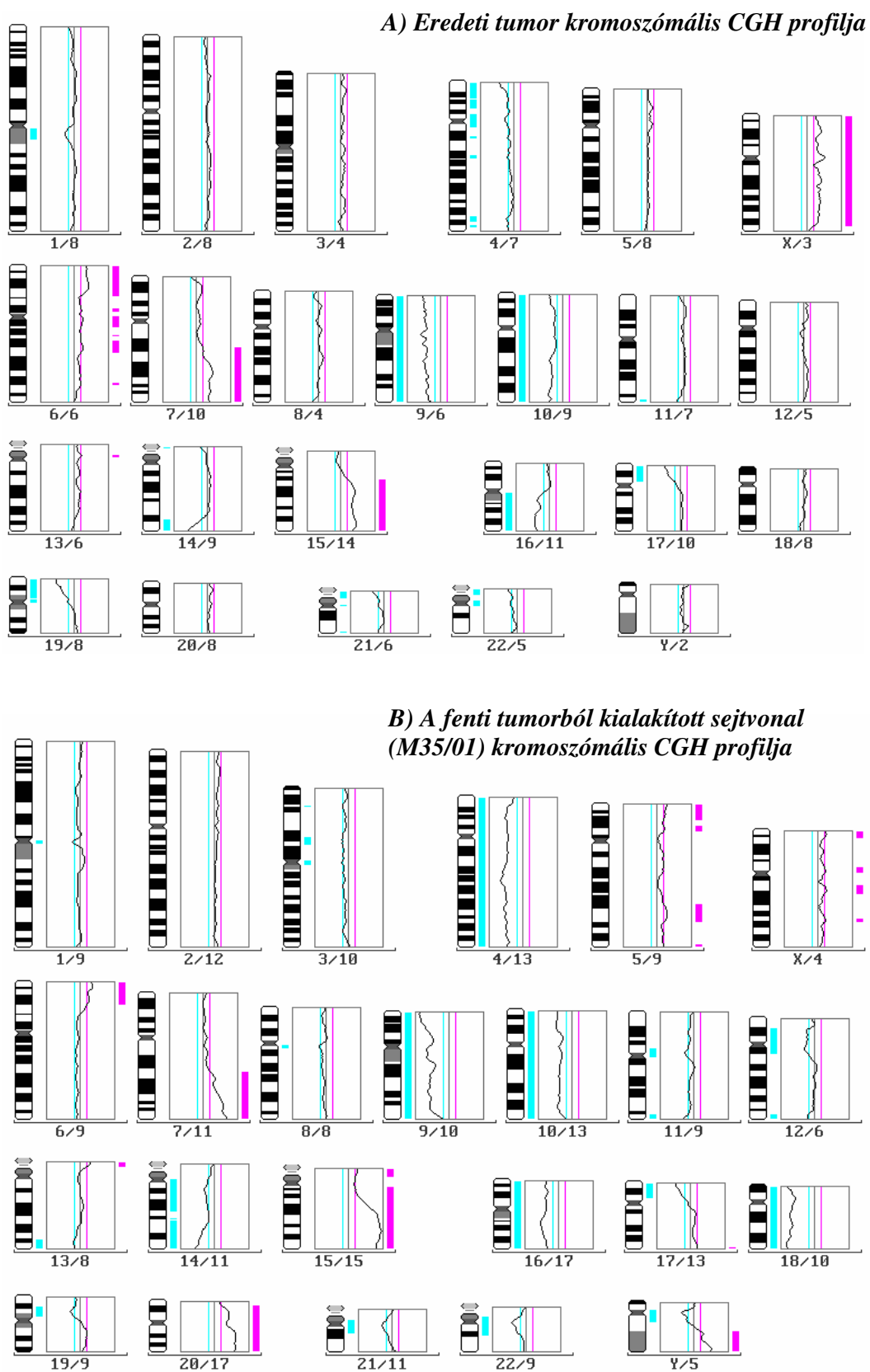
Immunhisztokémiai jelöléssel HLA-A2, HLA II, HMB45 antigén expressziót figyeltünk meg, ugyanakkor a MART-1 antigén expressziója nem volt egyértelmű, S100B antigént pedig nem tudtuk kimutatni. A fehérje expresszió mértékét áramlási citométerrel határoztuk meg (*Országos Onkológiai Intézet*).

Az új sejtvonal molekuláris genetikai karakterizálását több módszer (CGH, G-sávozás, SKY-FISH, FISH interfázisos sejtmagokon és kromoszóma preparátumokon) együttes alkalmazásával végeztük el.

Az M35/01 sejtvonal és az eredeti primer melanoma genetikai eltéréseinek összehasonlítása

A primer daganat és az abból létrehozott sejtvonal genetikai eltéréseinek összehasonlítására CGH vizsgálatot végeztünk. A **3. ábra A)** része a primer tumor, **B)** része az M35/01 sejtvonal CGH profilját mutatja be. Amint az a CGH profilok kromoszómánkénti összehasonlításából látható, az eredeti tumor és az M35/01 sejtvonal számos azonos genetikai elváltozást mutat, ami a közös eredetet jelzi, ugyanakkor olyan eltérések is láthatóak, melyek arra utalnak, hogy a) az eredeti tumor genetikailag heterogén sejtklónokat tartalmazott, b) az *in vitro* tenyésztés során genetikai szinten változások jöttek létre, illetve az eredeti heterogén tumorban voltak olyan eltérések, melyek a natív sejtekben kisebb százalékban fordulnak elő. A CGH-el megfigyelt legjellemzőbb közös eltérések a -4p, +6p22-pter, +7q21-qter, -9, -10, -14q32-qter, +15q15-qter, -16q, -17p, -19p12-p13 kromoszómaszakaszokat érintették. A csak a sejtvonalban megjelenő eltérések az 5p14-pter, és a 12p12-q13.12 kromoszómaszakaszok és a 18-as kromoszóma delécióját, illetve a 20-as kromoszóma többletét jelentetik (**3. ábra**).

3. ábra Felszínen terjedő primer melanoma és az abból származtatott melanoma sejtvonal (M35/01) kromoszómális CGH profilja

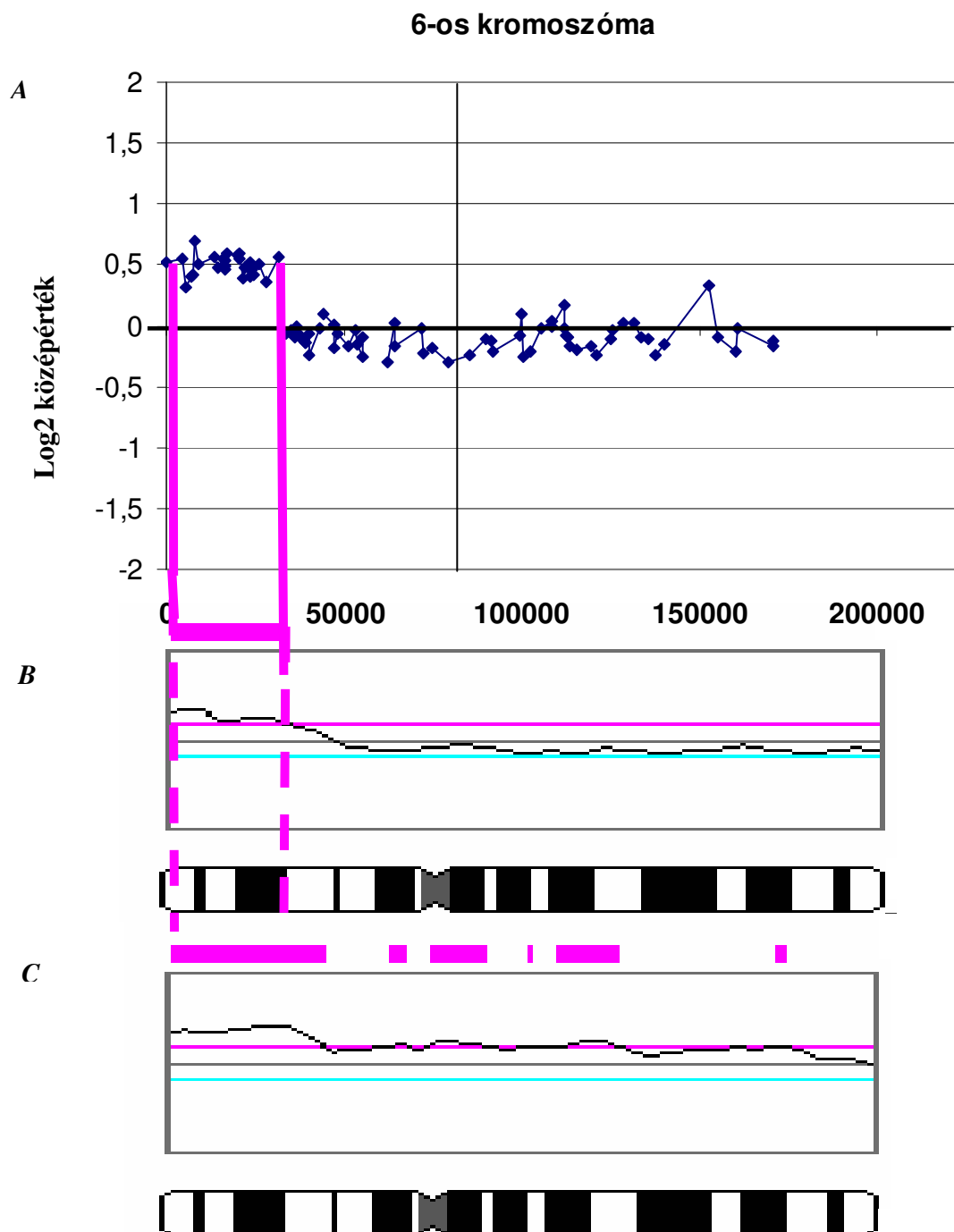


Tekintettel arra, hogy a kromoszómális CGH maximális felbontása 10 Mb, sokszor azonban csak a 20 Mb-nál nagyobb eltéréseket lehet csak kimutatni, vizsgálatainkat 2460, pontosan lokalizált BAC klónt tartalmazó CGH microarray-en is elvégeztük. A **4. ábra A)** részlete a 6-os kromoszóma array-CGH, **B)** részlete a sejtvonal kromoszómális CGH, míg **C)** részlete az eredeti primer melanoma kromoszómális CGH hibridizációját szemlélteti. Az ábrán jól látható a kromoszómális CGH és az array-CGH kromoszóma profiljainak egyezése. Array-CGH-el több DNS szekvencia amplifikációját figyeltük meg. Ezek közül a legnagyobb mértékű amplifikációt az alábbi szekvenciák mutatták: 6p24 ($\text{Log}_2 = 0,69$), 6p22-p23 ($\text{Log}_2 = 0,59$), 6p21 ($\text{Log}_2 = 0,57$). A sejtvonalban deléciót a 6-os kromoszómán array-CGH-el sem találtunk.

Az **5. ábrán** valamennyi kromoszóma array-CGH analízise látható. A klasszikus CGH-el kapott kromoszómális eltéréseket az array-CGH eredményei nemcsak megerősítették, hanem számos egyedi lókuszt amplifikációjára is felhívták a figyelmet. Az array-CGH-el azonosított alterációk sokszor 600-1200 bázispárra terjedtek ki, melyeket kromoszómális CGH-el nem lehet kimutatni. Az M35/01-es sejtvonalban a BAC alapú array-CGH technikával több mint 200 DNS szegment (pontosan lokalizált DNS klón) amplifikációját, és 150-nél több lókuszt delécióját figyeltük meg.

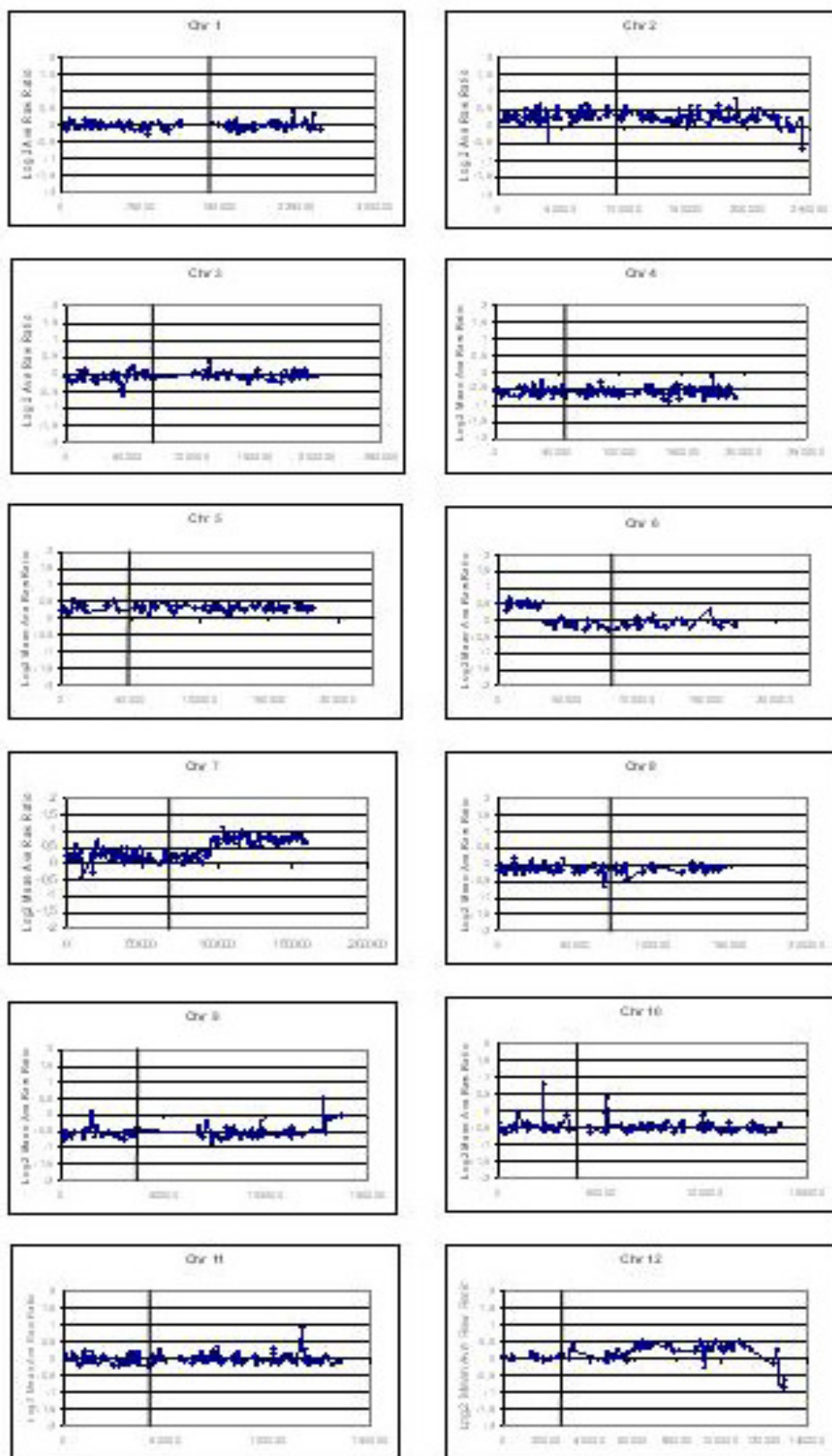
A melanománál gyakran eltéréseket mutató kromoszómák (6, 7, 9 és 10) mellett mindkét CGH módszerrel jelentős mértékű amplifikációt mutattunk ki a 15-ös és a 20-as kromoszómákon, illetve nagyfokú deléciót a 4-es, 14-es, 16-os, és 18-as kromoszómákon. Az array-CGH lényegesen nagyobb felbontásának köszönhetően a kromoszómális CGH-el kimutatott eltérések finomabb megkülönböztetése is lehetséges volt. Az array-CGH alapján a legnagyobb mértékű amplifikációt ($\text{Log}_2 > 0,6$) a 7q (7q22-q31), 15q (15q21-q25), 20q (20q13) kromoszómakarokon, a legnagyobb mértékű deléciót ($\text{Log}_2 < -0,6$) a 4q (4q12, 4q28-q31, 4q32-q33), 9p (9p21, 9p23, 9p24), 9q (9q21), 10q (10q23-q25), 12q (24.3), 16q (16q13-q21, 16q21, 16q23) 18p (18p11, 18q21-23), 17p (17p12) kromoszóma szakaszokon figyeltünk meg.

A sejtvonal array-CGH kísérlethez kontrollként alkalmazott, normál DNS hibridizációját követően valamennyi kromoszómánál a Log_2 érték $\pm 0,2$ között maradt, ami azt jelenti, hogy az általunk alkalmazott amplifikációs és deléciós szintek valamennyi eltérésre valódi amplifikációt ill. deléciót jelentettek.

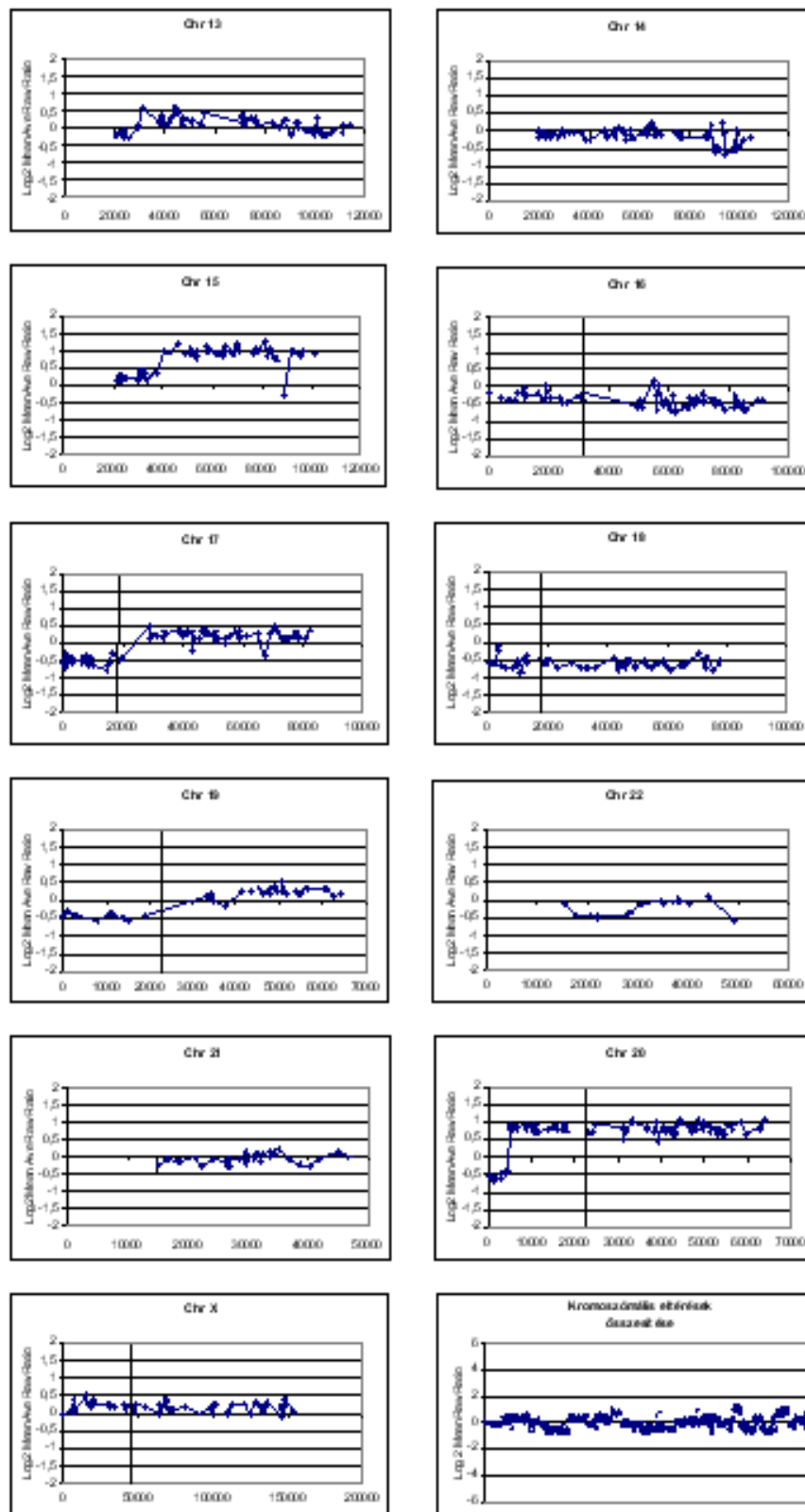


4. ábra Melanomában gyakori 6-os kromoszóma-eltérés az M35/01 sejtvonalnál array-CGH-el (A) és kromoszómális CGH-el (B), valamint az eredeti tumoron kromoszómális CGH-el (C). X-tengely: genomális pozíció; Y-tengely: Log2 középérték.

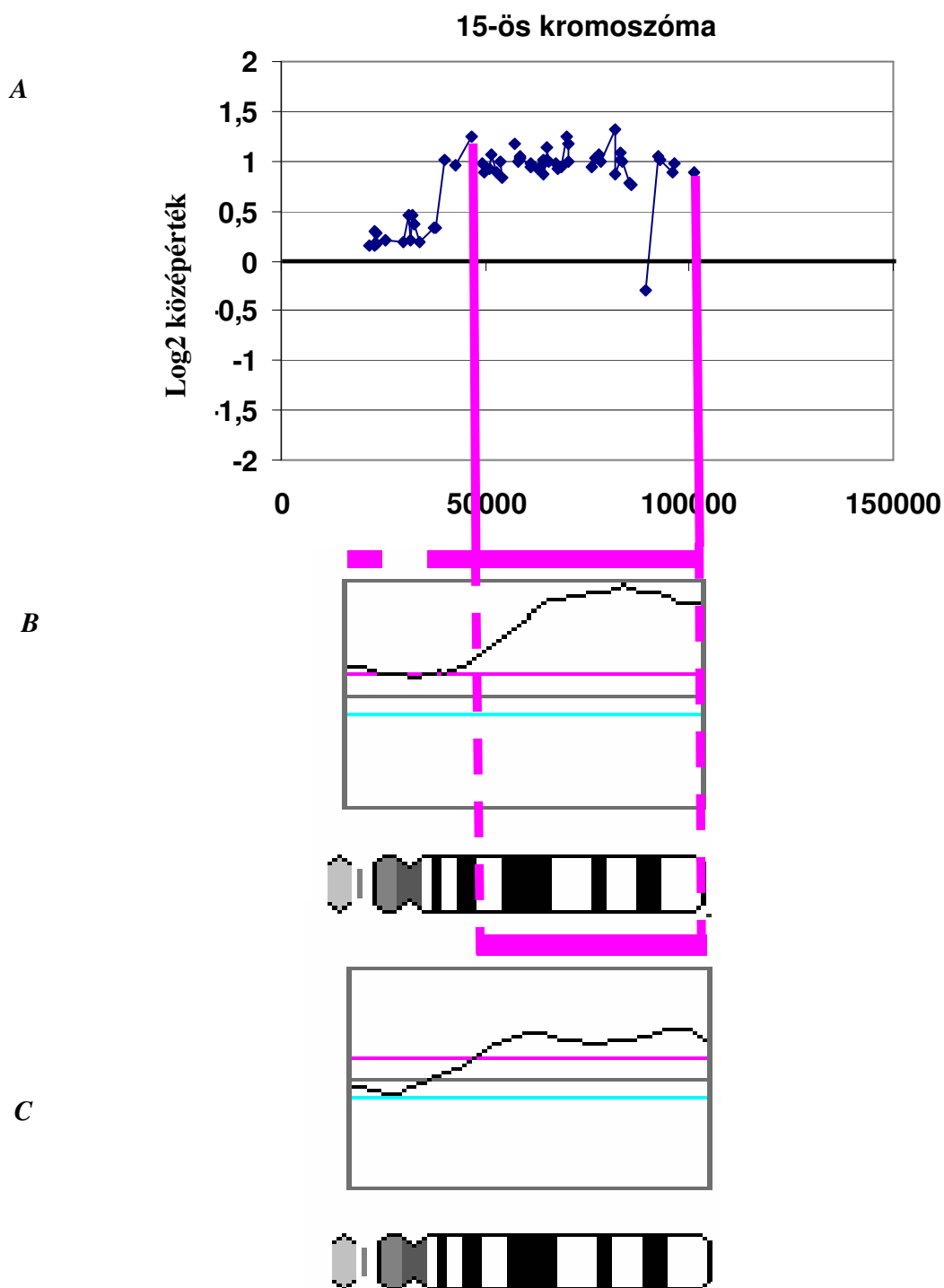
5. ábra Az M35/01 sejt vonal kromoszóma profilja az array-CGH alapján



5. ábra Az M35/01 sejt vonal kromoszóma profilja az array-CGH alapján (folytatás)



A legnagyobb kromoszómaszakaszt érintő amplifikációt a 15-ös kromoszómán találtuk **6. ábra**). Mindkét módszerrel teljes 4-es, 9-es, és 18-as kromoszóma vesztést figyeltünk meg. Kromoszómális CGH-el a 10-es kromoszóma esetében is teljes kromoszómavesztést tapasztaltunk, azonban array-CGH-el olyan nem-deletált klónok is elkülöníthetőekké váltak, melyek hagyományos CGH módszerrel nem mutathatóak ki.



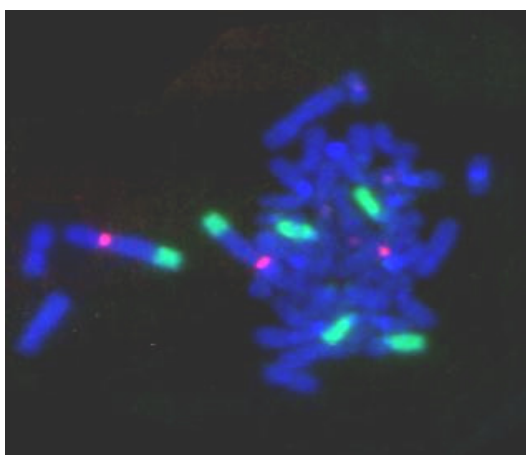
6. ábra A 15-ös kromoszóma eltérései nem tartoznak a gyakori kromoszómális elváltozások közé melanómában, az M35/01 sejtvonalnál azonban jelentős mértékű amplifikációt mutattunk ki mind array-CGH (A), mind kromoszómális CGH technikával (B). Az ábra C) részén az eredeti tumor 15-ös kromoszómájának CGH-képe látható. X-tengely: genomális pozíció; Y-tengely: Log₂ középérték.

Kromoszómák számbeli eltéréseinek analízise interfázisos sejtekben

A 14-es és 19-es kromoszómákon kívül valamennyi centroméra hibridizációját elvégeztük, e két kromoszóma centroméra régióinak azonossága olyan nagyfokú, hogy centroméra-specifikus FISH szondákkal megkülönböztetésük nem lehetséges. Hasonló probléma a 13-as és 21-es kromoszómáknál is fennáll, azonban ezen kromoszómák számbeli eltéréseinek analízisére a diagnosztikában ma már általánosan használt 13q14 és 21q22.13-q22.2 szondákat alkalmaztuk. FISH adataink szerint a sejtvonalra a kromoszómák triszómiája vagy tetraszómiája jellemző. Az 1-es, 3-as, 4-es, 6-os, 8-as, 10-es, 11-es, 16-os és 21-es kromoszómánál a sejtek több mint 50 %-ában három, míg a 2-es, 5-ös, 7-es, 15-ös, 17-es kromoszómánál négy fluoreszcens szignált figyeltünk meg. A 12-es kromoszóma a sejtek 42 %-ában triszómiás, 48 %-ában tetraszómiás volt. Az autoszóm kromoszómák közül csak a 9-es, a 18-as, és a 20-as volt diszómiás, de a diszómiás sejtek aránya egyedül a 18-as kromoszómánál haladta meg a 90 %-ot. A 20-as kromoszóma triszómiája a sejtek 31 %-ára volt jellemző. A legheterogénebb eloszlást a 9-es kromoszómánál figyeltük meg, ahol a domináns (2 szignál/sejt) sejtpopuláció mellett monoszómiás (8 %), triszómiás (16 %), és tetraszómiás (18 %) sejteket is találtunk. A nemi kromoszómákra a domináns sejtpopuláció egyértelműen diszómiás volt (X kromoszóma 98 %; Y kromoszóma 94%).

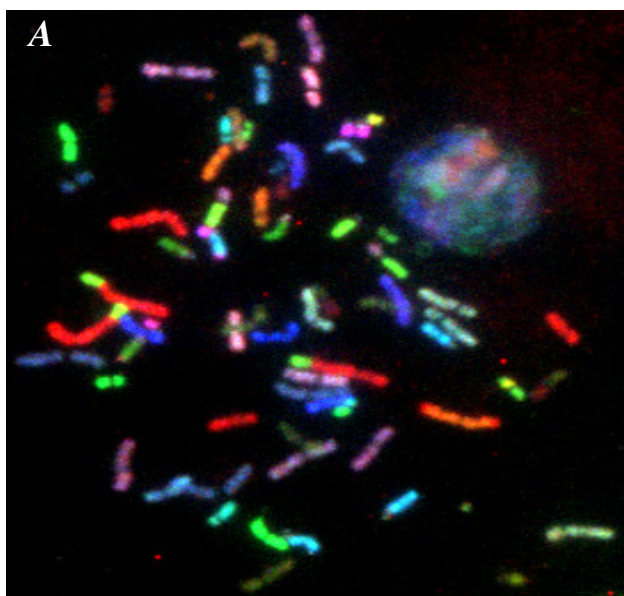
Kromoszómális átrendeződések vizsgálata: SKY-FISH analízis

Az M35/01 sejtvonal kariotípusának meghatározásához kromoszóma preparátumot készítettünk. G-sávozás alapján a kromoszómaszám 65 és 82 között változott, ami közel triploid kariotípust jelez. Megfigyeltünk számos kromoszómális átrendeződést is, melyek jelentős részének eredetét a sávozás gyenge felbontása miatt nem tudtuk meghatározni.



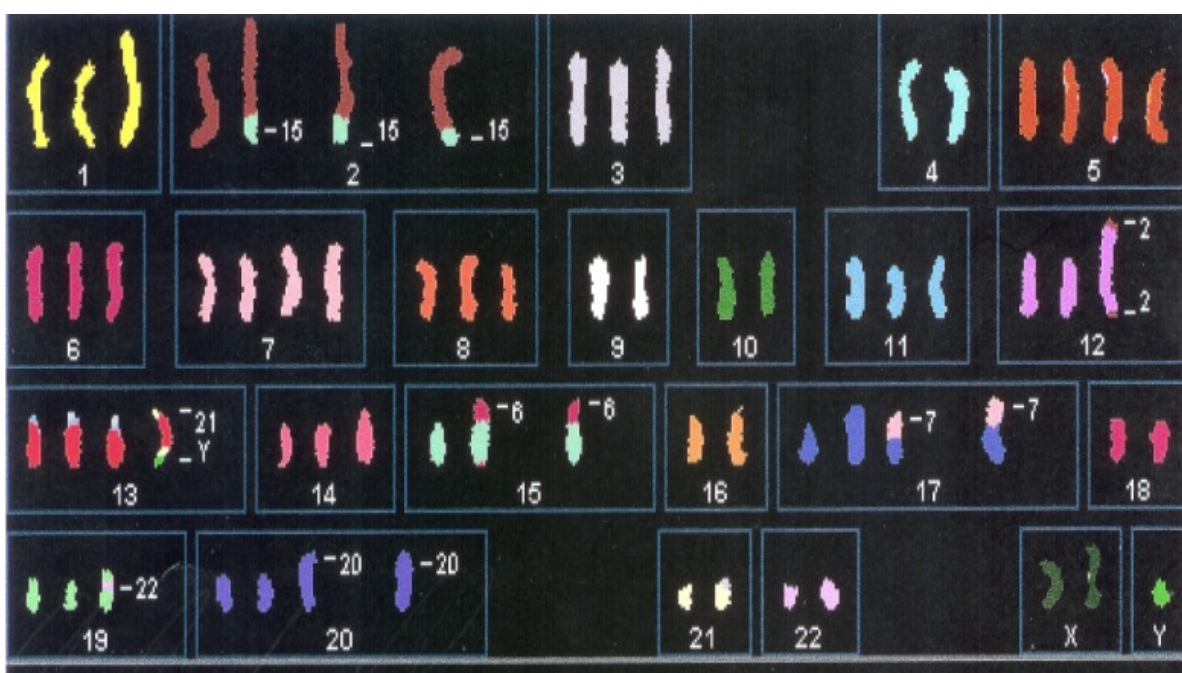
7. ábra FISH az M35/01 sejtvonalon 2-es kromoszóma centroméra specifikus-szondával (piros) és 15-ös kromoszóma specifikus festő szondával.

A strukturális eltérések kimutatására kromoszómafestő-szondákat alkalmaztunk, azonban a rendelkezésünkre álló festőszonda kombinációkkal (Spectrum Green jelzett 2-es, 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 15-ös, és SpectrumRed jelzett 11-es, 13-as, 20-as, 21-es és 22-es kromoszóma-specifikus szondák), illetve festő- és centroméra-specifikus szondákkal transzlokációt kevés esetben sikerült egyértelműen azonosítani (7. ábra). A G-sávozás ma rendelkezésre álló legmodernebb alternatív módszerének alkalmazásával, SKY-FISH technikával a kromoszóma átrendeződések, transzlokációk és marker kromoszómák sorozata tárható fel (8. ábra).



8. ábra A M35/01 melanoma sejtvonalon elvégzett SKY-FISH analízisről készült mikroszkópos felvétel (A), és a sejtvonal színes kariotípusa (B). Centroméra- és festőszondák sorozatával történő hibdirizációk jó egyezést mutattak a SKY-FISH eredményeivel.

B



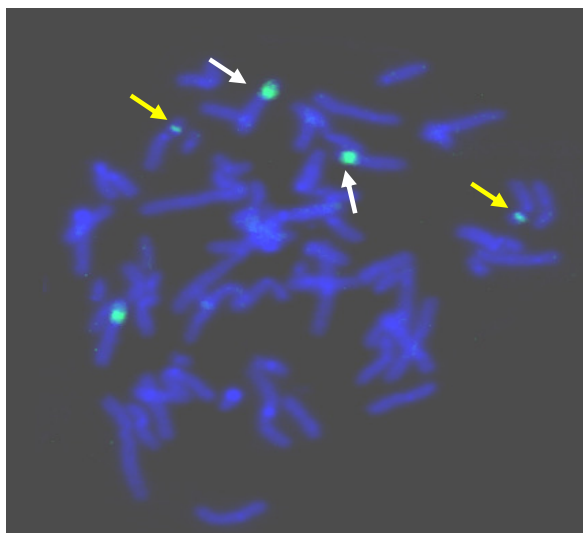
A kromoszómák számbeli eltérésein kívül a SKY-analízis a vizsgált metafázisokban ugyanazokat a többszörös átrendeződéseket mutatta. Az átrendeződések 12 kromoszómát érintettek, és legalább 15 különböző töréspontot foglaltak magukban. A kromoszómák komplex újrendeződését figyeltük meg a 2-es és 15-ös (der(2)t(2;15), a 2-es és 12-es (der(2)t(2;12;2)), a 13-as, 21-es és az Y (der(13)t(Y;13;21)), a 6-os és 15-ös (der(15)t(6;15)), a 7-es és 17-es (der(17)t(7;17), valamint a 19-es és a 22-es (der(19)t(19;22;19) kromoszómák között. A metafázisokban megfigyelt eltérések közül a 6-os és a 7-es kromoszómák többlete, valamint a 9-es és 10-es kromoszómák hiánya melanomákra gyakran leírt elváltozások. Jelen esetben ez utóbbi kromoszómák relatív veszteségét tudtuk kimutatni, azaz amíg a kromoszómák többsége 3, illetve 4 példányban volt jelen, addig a 9-es és a 10-es kromoszóma csupán két kópiában. Marker kromoszómát sem sávzással, sem a SKY-analízissel nem találtunk. A SKY-FISH eredményeként a sejtvonal kariotípusa a következő: 68, XXY, 3Xder(2)t(2;15), -4, +5, -9, -10, -11, der(2;12;2), +der(13)t(Y;13;21), 2Xder(15)t(6;15), -16, der(17)t(7;17), -18, der(19)t(19;22;19), add(20), +add(20), -21, -22.

Onkogének és tumorszuppresszor gének számbeli eltéréseinek vizsgálata gén- és lókuszszerű szondákkal

Az onkogének és tumorszuppresszor gének közül a *cyclin-D1 (11q13)*, *c-myc (8q24.12-q24.13)*, *egr1 (5q31)*, *egf-r (7p12)*, *p16-p14 (9p21)* és *Rb1(13q14)* amplifikáció, ill. deléció különböző daganatokban gyakran rossz prognózissal társul. Mivel az M35/01 sejtvonalban ezeket a géneket tartalmazó kromoszómák abnormális számban voltak jelen, megvizsgáltuk, hogy a gének kópiaszáma hogyan viszonyul a centroméraszámhoz. A fenti gének számbeli eloszlása hasonló volt a megfelelő kromoszómák centroméráira kapott értékekhez, ami azt jelzi, hogy a sejtvonal sejtjeiben ezek a gének sem deléciót, sem amplifikációt nem szenvedtek.

A teljes kromoszómafestő szondák mellett a 6p21-es kromoszómális régióra rendelkezésünkre állt ún. sávfestő DNS-szonda. Ennek a lókusznak elsősorban a radiális-vertikális fázis közötti átmenetben tulajdonítanak szerepet. Eredményeink szerint a 6-os kromoszómán egy töréspont pontosan ezen a lókuszon következett be (9. ábra).

A fentiek alapján az M35/01 sejtvonal alkalmas a felszínen terjedő melanomák biológiai viselkedésének további vizsgálatára, melyet a metasztatizáló képességgel összefüggésben szeretnénk a közeljövőben részletesen tovább folytatni.



9. ábra Hibridizáció a 6p21 lókuszs-specifikus szondával az M35/01 sejtvonal egy metafázisán. A 6-os kromoszómát érintő törés a kromoszóma rövidkarjának 21-es sávjában történt. A fehér színű nyilak egy-egy 6-os kromoszóma "végén" látható 6p21 sávdarabra mutatnak; a sárga nyilak a kisebb transzlokálódott részt jelölik.

5.3. Primer melanomák és melanoma metasztázisok cDNS alapú array-CGH vizsgálata

A dolgozat utolsó részében azokról a vizsgálatainkról szeretnék beszámolni, melyek célja a melanoma-progresszióban szerepet játszó onkogének és tumorszuppresszor gének azonosítása, majd ezt követően azok expressziós szintjének vizsgálata ugyanazon a cDNS chipen. cDNS alapú array-CGH módszerrel eddig 9 melanoma (4 primer, 3 metasztázis, 1 sejtvonal), és 1 eredetileg melanomának diagnosztizált fibrosus histiocytoma és metasztázisa eltéréseit elemeztünk. A cDNS array vizsgálattal analizált daganatok klinikopatológiai adatait a *9.-es táblázat*ban tüntettük fel.

9. táblázat Array-CGH vizsgálattal analizált daganatok klinikopatológiai jellemzői

Szövetszám	Típus	Nem	Életkor a diagnóziskor	Breslow vastagság (mm)	TNM-besorolás	Lokalizáció
280/00	SSM	Nő	62	40,0	T4bN2M0	Has
298/00*	nyirokcsomó					
114/04	ALM	Nő	49	3,6	T4aN1M0	Sarok
115/04*	nyirokcsomó					
873/98	Fibrosus histiocytoma	Férfi	40			Hát
874/98*	nyirokcsomó					
244/98	NM	Nő	23	10,0	T4bN2bM0	Fej
247/98*	nyirokcsomó					
141/04	ALM	Férfi	73	7,0	T4bN1M0	Sarok

*298/00: a 280/00, a 115/04: a 114/04, számú primer melanoma nyirokcsomó metasztázis párja
874/98: a histiocytoma nyirokcsomó metasztázisa (korábban melanomának karakterizált); 247/98: a 244/98 számú daganat nyirokcsomó metasztázisa

A 12233 cDNS elemű chipok (<http://www.helsinki.fi/biochipcenter/index.htm>, *Biochip Biocenter, Helsinki, Finnország*) egyenként 379 random elhelyezett ismétlődő elemet tartalmaztak (46). A belső kontrollként használt elemekre kapott kalibrációs hányadosok 99,62 %-ban megegyeztek (a 7 chipen mindössze 6 olyan elem volt, melynek a hibridizációja ellentmondásos eredményt adott). Az array-CGH hibridizáció eredményességét jelzi, hogy a több mint 12000 cDNS elemből a minták többségében 9000 fölött volt a sikeresen hibridizálódott elemek száma (10. táblázat).

A 10. táblázatban kék színnel emeltük ki a hibridizálódott, pirossal a deletált, és zölddel az amplifikált cDNS elemek számát. A cDNS alapú array-CGH hibridizációnál 3 beteg esetében a primer tumort tekintettük referencia DNS-nek és az array hibridizációt egyszerre végeztük el a metasztázisból származó DNS-el. Ezekben a mintákban a primer és metasztázis genomjának nagymértékű hasonlósága miatt, a többi hibridizációhoz képest, kevesebb eltérést találtunk. A primer tumorban a genetikai eltérések olyan mértékű halmozódása alakult ki, melyhez kisszámú újabb eltérés létrejötte is elegendő volt, hogy a metasztázis makroszkóposan is megfigyelhetővé váljon.

10. táblázat cDNS array-CGH eredmények összefoglalása

Minta száma	280/00 298/00 ¹	114/04 115/04 ¹	873/98 874/98 ¹	141/04 ²	35/01 ^{2*}	244/98 ²	247/98 ²
Sikeresen hibridizálódott klónok száma	10 974	9 647	8 250	9 817	10 119	8 197	9 277
Sikeresen hibridizálódott klónok aránya (%)	90	79	67	80	83	67	76
<i>Deletált klónok száma³</i>	<i>344</i>	<i>110</i>	<i>653</i>	<i>705</i>	<i>1216</i>	<i>1123</i>	<i>2151</i>
Deletált klónok aránya (%)	3,1	1,1	7,9	7,2	12,0	13,7	23,2
<i>Amplifikált klónok száma⁴</i>	<i>184</i>	<i>355</i>	<i>987</i>	<i>683</i>	<i>1220</i>	<i>1209</i>	<i>1918</i>
Amplifikált klónok aránya (%)	1,7	3,7	12,0	7,0	12,0	14,7	20,7
Eltérések aránya összesen (%)	4,8	4,8	19,9	14,2	24,0	28,4	43,9

¹ az array hibridizáció során a metasztázist közvetlenül a primer daganattal hasonlítottuk össze

² az array hibridizáció során a referencia DNS normál humán vérből származó DNS volt

³ Kalibrációs ráta < 0,8

⁴ Kalibrációs ráta > 1,2

*metasztatikus potenciállal rendelkező primer melanoma sejtvonal

A primer tumorok normál DNS-hez történő hibridizációja, a 141/04 számú melanoma kivételével, jelentős számú genetikai alterációt mutatott. A legtöbb eltérést a

244/98 primer melanómában és 247/98 metasztázisában figyeltük meg. A 23 éves nőbetegből származó primer melanoma az agresszív noduláris altípusba tartozott. A metasztázisban a primer tumorhoz képest közel kétszer több cDNS elem amplifikációját és delécióját figyeltünk meg. Az értékelhető eredményt adó közös elemek közül 3315 mind a primer daganatban, mind a metasztázisban normálnak bizonyult (kalibrációs ráta (KR): 0,8–1,2); a primer tumorhoz viszonyítva 1358 elem a metasztázisban deléciót (metasztázis KR <0,8, primer KR >0,8); 1418 elem pedig amplifikációt mutatott (metasztázis KR >1,2, primer <1,2).

A primer tumorok array-CGH eredményeinek összehasonlításakor 58 olyan ismert gént mutattunk ki, melyek minden mintában deletálva (31 gén), illetve minden mintában amplifikálva (27 gén) voltak (11. és 12. táblázat).

11. táblázat Következétesen deletált gének és kromoszómális lokalizációjuk

Gének	Kromoszómális lokalizáció	Kalibrációs hányados		
		35/01	141/04	244/98
RBBP4	1p34.3	0,7546	0,6833	0,1095
ACP6	1q21	0,6988	0,7648	0,7714
RAB13	1q21.2	0,5947	0,6933	0,7766
CCT3	1q23	0,4535	0,6552	0,7501
EXO1	1q42-q43	0,5732	0,6376	0,6168
CPSF3	2p25.2	0,4971	0,5779	0,6638
WNT6	2q35	0,7529	0,6126	0,7493
EIF4EL3	2q37.1	0,7625	0,6120	0,7233
MAIL	3p12-q12	0,7394	0,4616	0,7352
LOC201895	4p14	0,6746	0,7190	0,7516
CASP6	4q25	0,6924	0,7911	0,6797
FLJ11539	4q34.1	0,6111	0,6486	0,7997
RPS10	6p21.31	0,7083	0,5226	0,0737
SWAP70	11p15	0,4486	0,5524	0,5222
PSMA1	11p15.1	0,3767	0,5949	0,6466
RAB6A	11q13.3	0,7795	0,7662	0,0831
MGC14839	11q23.2	0,5333	0,7649	0,7423
RICS	11q24-q25	0,6474	0,6329	0,1898
MGC15416	16p13.3	0,5987	0,6868	0,6814
CHD3	17p13.1	0,4613	0,7654	0,6733
BCL2	18q21.33	0,7640	0,7432	0,7889
VAV1	19p13.2	0,3759	0,6675	0,6762
SNRPD2	19q13.2	0,6078	0,7313	0,1809
GMFG	19q13.2	0,7596	0,4959	0,5298
CHAF1B	21q22.13	0,5851	0,5498	0,7905
COMT	22q11.21-q11.23	0,5985	0,7895	0,6212
HMG2L1	22q13.1	0,4761	0,1600	0,2933

12. táblázat Következésként amplifikált gének és kromoszómális lokalizációjuk

Amplifikált				
Gének	Kromoszómális lokalizáció	Kalibrációs hányados		
		35/01	141/04	244/98
HHLA3	1p31.2	2,5683	1,6784	1,4787
FLJ20277	1p34.1	1,8054	1,2561	1,4065
KIAA1724	2p24.1	2,8436	1,4605	2,1753
ERCC3	2q21	1,9557	1,2513	1,2305
BZW1	2q33	2,1193	1,2328	1,4125
ENDOGL1	3p21.3	2,4838	1,4679	1,3858
ATP1B3	3q22-q23	2,5488	1,4002	1,8334
KIAA0746	4p15.31	2,4598	1,2559	1,4586
ICF45	5q33.3	1,2524	1,2404	1,2650
ETEA	5q35.3	1,2033	1,2595	1,3957
C6orf110	6p21.1	1,5712	1,2791	1,4955
MRPL2	6p21.3	1,3395	1,4636	1,4643
RNF39	6p21.3	2,2666	1,2630	1,5568
ARHGAP18	6q22.33	2,7943	1,3127	1,8425
LRRN4	7q22	2,6582	1,2173	1,6568
COPG2	7q32	2,2486	1,6820	1,2631
LHX3	9q34.3	1,6064	1,2698	1,4366
CLIC3	9q34.3	2,3987	1,4809	1,5231
DPP3	11q12-q13.1	1,3722	1,2115	1,2354
PFKM	12q13.3	1,9021	1,2469	1,4257
POLE	12q24.3	1,3552	1,3061	1,2908
RNF6	13q12.2	1,5132	1,2559	1,2361
REC14	15q24.1	1,9918	1,3732	1,4114
FLJ12484	15q25.3	2,1208	1,2763	1,4018
CYB5-M	16q22.1	1,7772	1,3558	2,0750
FN3KRP	17q25.3	1,2914	1,2543	1,5178
TH1L	20q13	2,8052	1,3696	1,2484
IL10RB	21q22.1-q22.2	1,2825	1,3212	1,2080
DNMT3L	21q22.3	1,2280	1,2110	1,6271
DKFZp761A052	Xp11.23	1,2569	1,2374	1,2457
RBMX	Xq26	1,8913	1,3216	1,7805

6. MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt két évtizedben a melanoma incidenciája világszerte rohamos növekedést mutat. A gyakran agresszív lefolyású, fokozott kiújulási és áttétképzési hajlammal jellemezhető daganat komoly kihívást jelent a kezelőorvosnak. Sajnos a terápiás beavatkozások sok esetben sikertelenek, a metasztázisban szenvedő betegeknél csupán az esetek 15-20%-ában hoznak átmeneti eredményt. A hagyományos, komplex kemo-, immun-, és sugárterápiás kezelések mellett egyre jelentősebbek az új, tumorbiológiai ismeretekre épülő kezelési stratégiák, ezek kombinálása a kezelés hatásosságát fokozhatja, így pl. metasztatikus melanomák kezelése során igen hatásos válasz érhető el az un. biokemoterápia alkalmazásával (48).

A melanoma metasztázis kialakulásának megjósolása, és ezzel szükség esetén a korai és/vagy agresszívebb kezelés megkezdése, esélyt jelenthet a tartósabb gyógyulásra, azonban az ilyen jellegű beavatkozások alapját képező molekuláris biológiai, genetikai markerek száma igen kevés. Annak ellenére, hogy a melanoma két leggyakoribb típusa (felszínen terjedő és noduláris melanoma) biológiai viselkedés szempontjából lényeges különbséget mutat, kevés olyan tanulmány jelent meg, melyben ennek molekuláris hátterét kutatták (14,49). Tanulmányunk során vizsgáltuk:

- az eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák kromoszómális eltéréseit;
- korábbi CGH eredményeinkre támaszkodva a *c-myc* onkogén amplifikáció szerepét felszínen terjedő és noduláris melanomákban;
- egy felszínen terjedő primer melanoma és az abból újonnan származtatott sejtvonal genetikai eltérései közötti azonosságokat és eltéréseket;
- cDNS alapú array-CGH hibridizációval primer-metasztázis tumorpárok genetikai eltéréseit.

6.1. A *c-myc* onkogén amplifikációjának vizsgálata noduláris és felszínen terjedő primer melanomákban és melanoma metasztázisokban

Humán melanomákban standard citogenetikai módszerekkel a kromoszómális eltérések sorozatát derítették fel, ezek közül az 1-es, 6-os, 7-es, 9-es és 10-es kromoszómák számbeli és strukturális eltéréseit írták le leggyakrabban (27,50,51). A klasszikus citogenetikával nyert megfigyeléseket saját és mások CGH adatai sok szempontból alátámasztották, de számos új, sávozásos technikával nem észlelt eltérést is sikerült kimutatni (24,51). Ezek közül az elváltozások közül szembetűnő volt a 8-as kromoszóma hosszúkarjának amplifikációja (8q22-qter), amit standard citogenetika módszerekkel

végzett kísérletekben csak ritkán figyeltek meg. A CGH analízissel felismert DNS többlet a 8-as kromoszóma hosszúkarjának disztális szakaszára esett, érintve a 8q22-pter régiót (24). Tekintettel arra, hogy a *c-myc* gén a 8q24.12-q24.13-as lókuszon lokalizálódik, és amplifikációja számos daganattípusnál rossz prognózissal társul, a 8q22-pter eltérések sejtszintű analízisét a *c-myc* onkogén amplifikációjának részletes vizsgálatával kezdtük. A génamplifikáció mértékének részletes tanulmányozását az is indokolta, hogy eddig kevesebb mint 10 primer melanoma *c-myc* analízisét írták le (42,47). A *c-myc* onkogén melanoma-progresszióban betöltött szerepét jelzi, hogy a c-MYC fehérje expressziójának csökkenését eredményező *c-myc* antiszensz oligonukleotidokkal a melanomasejtek növekedése gátolható, ami arra utal, hogy a génextpresszió blokkolása antiszensz technikával új génterápiás stratégiát jelenthet az előrehaladott stádiumú melanomák kezelésében (53).

A *c-myc* onkogénre vonatkozó vizsgálataink fő célja a gén kópiaszám eloszlásának sejtszintű analízise volt különböző biológiai viselkedésű melanoma altípusokban (noduláris- és felszínen terjedő melanomák) és melanoma metasztázisokban. Interfázisos FISH analízissel 68 melanoma mintát (26 NM, 28 SSM és 14 metasztázis) tanulmányoztunk. A primer melanomák és melanoma metasztázisok kromoszóma-ploiditás szintjének meghatározásához az 1-es, 3-as, 6-os, 7-es, 9-es és 10-es kromoszómák sejtenkénti megoszlását is elemeztük centroméra-specifikus DNS-szondákkal.

A 68 tumorból mindössze egy felszínen terjedő melanoma sejteiben nem találtunk a vizsgált kromoszómákra eltérést; a noduláris alcsoportba tartozó valamennyi daganatnál legalább három kromoszóma számbeli eltérést mutatott. Az 1-es 3-as, 6-os, 7-es és 8-as kromoszómák poliszómiája a noduláris altípusban gyakoribb volt. Szignifikánsan több NM-ben mutattuk ki a 6-os kromoszóma poliszómiáját ($p=0,01$). Érdeemes megjegyezni, hogy a 6-os kromoszóma deléciójáról gyakrabban számoltak be kromoszómasávozást követő analízisekben (54), mint annak többletéről (55), ugyanakkor CGH vizsgálatok a 6-os kromoszóma amplifikációját valószínűsítik (24,52). Más citogenetikai és FISH vizsgálatokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy az egyik 9-es kromoszóma elvesztése a szuperficiális altípusnál, míg a 10-es kromoszóma egyik centromerájának deléciója a noduláris melanomáknál gyakoribb elváltozás (14,56). Összességében a noduláris altípusba tartozó melanomák ploiditás értéke, amit a kromoszóma-index tükröz, nagyobb volt, mint a felszínen terjedő csoportba tartozó lézióké, azonban ez a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg azonban a *c-myc* onkogén kópiaszám eltérésre a két melanoma altípus között. Megállapítottuk, hogy az

agresszívebb biológiai tulajdonságú NM-ben a *c-myc* onkogén kópiaszám emelkedés szignifikánsan gyakoribb volt, mint a jobb prognózisú SS M-ben. A noduláris melanómák 61 %-ában, míg a felszínen terjedő melanómáknak csupán 27 %-ában volt kimutatható extra *c-myc* szignál ($p=0,02$). A *c-myc*/C8 kópiaszám arány, ami lehetővé teszi a valódi génamplifikáció és a poliszómia elkülönítését, szintén gyakoribb volt a noduláris altípusban ($p=0,01$). A *c-myc* génamplifikáció mértéke általában alacsony vagy közepes mértékű volt, viszonylag magas fokú amplifikációs szintet (*c-myc*/C8 kópiaszám arány >3) csak a noduláris altípusban tudtunk kimutatni. Eredményeink arra utalnak, hogy az emelkedett *c-myc* géndózis, más genetikai eltérésekkel társulva, hozzájárulhat az eltérő biológiai viselkedés kialakulásához és az invazív növekedéshez.

Tizennégy betegnél a primer melanómákban megfigyelt *c-myc* gén kópiaszám eltéréseit a metasztázisok eltéréseivel is sikerült összehasonlítani, ilyen vizsgálatokra irodalmi adatok szerint még nem került sor. Az ugyanabból a betegből származó primer-metasztázis tumorpárok molekuláris eltéréseinek összehasonlítása a daganatprogresszió különösen fontos aspektusaira világíthat rá. A primer tumorban még nem, de a metasztázisban már meglévő domináns eltérések a metasztázis kialakulásához vezető aberrációkra hívják fel a figyelmet (24).

Vizsgálatunk során tanulmányozott melanoma metasztázisok mindössze 21 %-ában (14 tumorból 4) sikerült kimutatni alacsony vagy mérsékelt fokú *c-myc* amplifikációt. Hasonlóan kismértékű génamplifikációt találtak 32 melanoma metasztázis interfázisos *c-myc* FISH analízise során Kraehn és mtsai. Eredményeik szerint a *c-myc*/C8 arány a melanoma metasztázisokban 0,9 és 2,9 között változott, és mindössze a metasztázisok 10 %-ánál volt $>1,5$, ami mérsékelt amplifikációs szintet jelent (42). A primer melanómák és metasztázisaik között fennálló ilyen típusú genetikai divergencia oka lehet az a nagyfokú kromoszómális heterogenitás, ami a primer melanómák már viszonylag korai stádiumára is jellemző (57). Ha a metasztatikus tumorsejtek a daganatprogresszió viszonylag korai szakaszában elhagyják a primer daganatot, előfordulhat, hogy a primer tumorban meglévő heterogén sejtpopulációk közül az, amelyik a daganat lokális inváziójáért felelős, nem feltétlenül egyezik meg azzal a klónnal, amelyik a metasztázis kialakulásában játszik szerepet. Ez azt a lehetőséget is felveti, hogy a daganat metasztatizáló képessége már a primer tumor igen korai stádiumában eldőlt. Primer daganatok és metasztázisaik ellentmondásos *c-myc* amplifikációs mintázatáról emlő-, tüdő- és hasnyálmirigy daganatoknál is beszámoltak (58,59). Ezen vizsgálatok szerint a metasztázisokban a *c-myc* onkogén extra kópiaszámának előfordulási gyakorisága, a

megfelelő primer lézióhoz viszonyítva, alacsonyabb, vagy egyáltalán nincs *c-myc* amplifikáció. Ez azt jelzi, hogy a *c-myc* gén amplifikációja elsődlegesen nem a metasztatikus folyamatban, hanem az invazív potenciál kialakulásában játszhat szerepet (58). Az extra *c-myc* kópia kialakulásának hátterében különböző molekuláris mechanizmusok állhatnak: i.) származhat a gént hordozó egész kromoszóma megtöbbszörözéséből; ii.) eredménye lehet a 8-as kromoszóma hibás szétválásának; iii.) létrejöhet izokromoszóma kialakulása révén; és iv.) kialakulhat intra- és extra-kromoszómális amplifikációt követően (42). Az amplifikált szekvencia maradhat eredeti kromoszómális pozíciójában, azonban transzlokálódhat másik kromoszómára is. Az amplifikáció helye és mechanizmusa nem határozható meg interfázisos citogenetikával. Ha a daganat progressziója során épp a *c-myc* gént tartalmazó kromoszóma vagy kromoszóma szegmens szenved deléciót, a gén kópiaszáma és az amplifikáció mértéke csökkenni fog. Elképzelhető azonban az is, hogy a 8-as kromoszóma centroméra-régiójának megtöbbszöröződése nincs lineáris kapcsolatban a *c-myc* gén megtöbbszöröződésével, ami a *c-myc*/C8 kópiaszám arány csökkenését, vagy akár emelkedését vonhatja maga után. A vizsgált melanoma metasztázisok közül 6 daganatban *c-myc* kópiaszám emelkedést tapasztaltunk a primer tumorhoz képest, ami az átlagos 8-as kromoszóma centroméra régióra specifikus szignálszám növekedésével társult. Hat metasztázisnál a 8-as kromoszóma vesztést *c-myc* kópiaszám csökkenés kísérte, jelezve a *c-myc* gén feltételezhető intra-kromoszómális lokalizációját. A *c-myc* gén megoszlása szinte valamennyi mintában heterogén volt, ami azt sugallja, hogy a daganatsejtek eltérő növekedési potenciállal rendelkeztek (56).

A *c-myc* amplifikáció jelenségét noduláris melanómában Greulich és mtsai. írták le először, munkájuk során egyetlen primer melanoma CGH és FISH eltéréseit elemezték (47). Ebben a primer melanómában a 8q kromoszómakar megtöbbszöröződését a *c-myc* onkogén kópiaszám növekedésével hozták kapcsolatba (47). Ez az eset különlegesnek számított abból a szempontból, hogy a tumor 5,25 mm vastagsága rossz prognózisra utalt, azonban a daganat eltávolítását követő 3 éven belül a betegnél nem alakult ki metasztázis. A Kraehn és mtsai. 33 melanoma metasztázist, és mindössze 8 primer daganatot analizáltak FISH módszerrel (42). A primer tumorok közül négyenél a 8-as centromérához viszonyítva extra *c-myc* kópiát találtak. Fontos megjegyezni, hogy mind a négy lézió noduláris melanoma volt, ami alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a *c-myc* onkogén fokozott jelenléte melanómákban invazív potenciállal társulhat. Az említett tanulmányban a *c-myc* gén amplifikációja (*c-myc*/C8 arány) az általunk megfigyelthez hasonló mértékű

volt (42). A metasztázisok közül egyik mintában sem figyeltek meg nagymértékű amplifikációt. A *c-myc*/C8 arány 3,0 alatt maradt, bár két metasztázis, melyek primer tumorpárjainak vastagsága 0,74 illetve 1,13 mm volt, emelkedett *c-myc*/C8 arányt mutatott. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy ezeknek a daganatoknak a klasszikus besorolás alapján nem várt, gyors progressziója az emelkedett *c-myc* kópiaszámmal is kapcsolatban állhat (42). A primer tumorokra vonatkozó FISH adatokat a szerzők nem közölték. Az általunk analizált metasztázisokban a legmagasabb *c-myc*/C8 arány 2,5-nek adódott. Hasonlóan a Kraehn és mtsai. által leírtakhoz, ennek a betegnek a primer daganata is viszonylag vékony (1,5 mm), felszínen terjedő melanoma volt, és a metasztázist a primer tumor diagnózisát követően 3 hónap múlva észlelték, ami további példája annak, hogy a 8-as centromérához viszonyított *c-myc* gén kópiaszám emelkedés rossz prognózissal társul, még akkor is, ha a primer lézió klinikopatológiai paraméterei alapján a betegség kedvezőbb lefolyása lenne várható (42).

Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy a *c-myc* onkogén overexpressziója jobb prognosztikus marker lehet, mint a korábban használt klinikopatológiai faktorok (Breslow-vastagság és nodális státusz) (60,61). Felvetették, hogy a *c-myc* kópiaszám aberráció *c-MYC* fehérje overexpresszióval társulhat, és a *c-myc* gén az előrehaladott stádiumú bőrmelanomákban nagyobb számban lehet jelen (61). Ezzel ellentétben Boni és mtsai. a *c-MYC* fehérje expresszió mértékét a metasztatikus potenciáltól és a metasztázis kialakulásától függetlennek találták, így azt a következtetést vonták le, hogy bőrmelanománál nem használható prognosztikus immunhisztokémiai markerként (62).

Interfázios FISH eredményeink statisztikai analízise nem mutatott összefüggést a két primer melanoma altípus összehasonlításakor sem a betegek életkora, sem azok neme és a *c-myc* génelteráció mértéke között. A primer daganat lokalizációja és a *c-myc* eltérések között azonban összefüggést figyeltünk meg. Megállapítottuk, hogy a *c-myc*/C8 arány szignifikánsan gyakoribb volt a törzsön, vagy a fej-nyaki régió kialakult noduláris melanomáknál (56). Kismértékű összefüggést a tumor vastagsága és a *c-myc* gén kópiaszámának változása között is felfedeztünk, ez azonban nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket a különböző vastagság-kategóriák között. Az emelkedett *c-myc*/C8 kópiaszámmal jellemezhető daganatok arányában azonban szignifikáns eltérést tapasztaltunk, ha a két daganat altípust kifekélyesedett és kifekélyesedést nem mutató alcsoportokba soroltuk. Eredményeink szerint az ulcerált noduláris melanomáknál az emelkedett *c-myc*/C8 arány szignifikánsan eltért. Az emelkedett *c-myc*/C8 arány és a csökkent tünetmentes túlélési

idő között szintén összefüggést találtunk. Ross és mtsai. hasonló adatokat közöltek a fehérjeexpresszió szintjén primer melanómák vizsgálatát követően (60).

A génamplifikáció és az emelkedett gén és/vagy fehérjeexpresszió melanoma-progresszióban betöltött szerepének pontos megállapításához további vizsgálatokra van szükség. A *c-myc*/C8 kópiaszám arány kritikus elemzése, más markereket is figyelembe véve, segítheti kiemelni a betegek metasztázisképzés szempontjából különösen veszélyeztetett csoportját. Eredményeink arra utalnak, hogy a felszínen terjedő és a noduláris melanómák daganatsejtjeinek különböző biológiai viselkedése, más kromoszómális eltérések mellett, kapcsolatba hozható a *c-myc* onkogén eltérő kópiaszám mintázatával, azonban ennek végleges tisztázásához további, részletesebb, a gén-, és fehérjeexpressziót is magában foglaló vizsgálatokra van szükség.

6.2. Egy új melanoma sejtvonal átfogó citogenetikai jellemzése

A daganatok eltérő biológiai viselkedésének hátterében álló molekuláris eltérések megismerésében a sejtvonalak fontos szerepet töltenek be, sok esetben a legkönnyebben hozzáférhető és legolcsóbb modellt jelentik a kutatásokhoz. Az M35/01 sejtvonal karakterizálásával célunk egy genetikailag részletesen analizált melanoma sejtvonal leírása volt, az alkalmazott molekuláris genetikai módszerek sokfélesége azonban arra is rávilágított, hogy a genetikai eltérések pontosabb meghatározása számos módszertani megközelítés egyidejű alkalmazását követeli meg.

A kromoszómasávozás, kromoszómális és array-CGH, interfázisos FISH, valamint SKY-FISH módszerekkel az M35/01 sejtvonal számos, melanómákra jellemző eltérései mellett olyan alterációkra is felfigyeltünk, melyeket eddig nem közöltek. Vizsgálataink szerint a sejtvonal komplex kariotípussal jellemezhető, a kromoszómák számbeli eltérései mellett számos strukturális elváltozás is megfigyelhető. A teljes tumorgenomban fellelhető genetikai aberrációk elemzésére két, eltérő felbontású CGH módszert alkalmaztunk.

Kromoszómális CGH technikával az eredeti tumorból származó DNS CGH-profilját a sejtvonal CGH-profiljával összehasonlítva számos azonos eltérést figyeltünk meg, azonban találtunk csak a sejtvonalra jellemző alterációkat is. Mind a primer tumorban, mind a sejtvonalban DNS többletet detektáltunk a 6p22-pter, 7q21-qter, 15q15-qter lokuszokon, DNS hiányt mutattunk ki a 9, 10, 14q32-qter, 16q, 17p szakaszokon. A csak a sejtvonalban megjelenő eltérés a 12p12-q13.12 szakasz és a 18-as kromoszóma deléciója, valamint a 20-as kromoszóma többlete volt. A primer tumorban a 4-es és a 16-os

kromoszómán megfigyelt eltérések a sejtvonalban a kromoszómák teljes hosszára kiterjedtek. A primer tumor és a sejtvonal genetikai eltérései közötti különbség magyarázható egyrészt azzal, hogy az eredeti tumorban azok a sejtklónok, melyek az eltéréseket tartalmazták, kisebb százalékban voltak jelen, másrészt összefüggésben lehet azzal, hogy az eredeti daganatban meglévő normál sejtek kontaminációja csökkenti a genetikai eltérések kimutathatóságát, így egy genetikailag heterogén tumorban a kevésbé domináns eltéréseket elfedi (63). Természetesen nem zárható ki az sem, hogy a csak sejtvonalban észlelt eltérések az *in vitro* tenyésztés eredményeként jöttek létre. A sejtvonal kromoszómális és array-CGH eredményei nagyon jó korrelációt mutattak. A két módszer között az alapvető, és igen lényeges különbség, a módszerek felbontása mellett (kromoszómális CGH >20 Mb, array-CGH \cong 600bp-1 Mb), hogy array-CGH-el az amplifikált DNS szakaszok pozíciója, illetve az amplifikált vagy deletált gének, pontosan meghatározhatók (64). Ezzel függ össze az is, hogy array-CGH-el lényegesen több genomális eltérést találtunk, mint kromoszómális CGH-el (array-CGH-el az amplifikált klónok száma meghaladta a 200-at, míg a deletált klónok száma több mint 150 volt).

Mind a primer tumorban, mind a sejtvonalban jelentős amplifikációt figyeltünk meg a 6-os kromoszóma rövidkarján, ami hagyományos kariotípus analízissel és CGH-el is az egyik leggyakoribb kromoszómális eltérés melanomákban (24,51,52). Array-CGH-el a 6p kromoszóma karon 47 klónból 9 amplifikációt mutatott, ezek közül 5 klón lokalizációja a 6p22-es, 2 a 6p22-p23-as, 1 a 6p24-es, és 1 a 6p24-p25-ös szekvenciára esett. Ebben a régióban deléciót egyik módszerrel sem sikerült kimutatni. Ezekben a lókuszon melanoma-specifikus géneket még nem írtak le. A teljes genomban CGH-el felismert 6p amplifikáció kromoszómális szinten a 6-os kromoszóma rövidkarjának többszörös törését és transzlokációját jelentette. A 6p21 sáv-specifikus szondával sikerült egy a 6p21 lókuszon proximális régióját érintő töréspontot azonosítani. Ezen a kromoszómális szakaszon helyezkedik el a *ciklin-D1* és *ciklin-D2* protoonkogénekkal homológiát mutató *ciklin-D3* (CCND3) fehérjét kódoló gén. Kimutatták, hogy UV besugárzást követően a CCND3-hoz kapcsolódó CDK4 aktivitása szükséges ahhoz, hogy a sejtciklus túljusson a G2 fázison és így megkezdődhessen a mitózis. A legújabb megfigyelések szerint a CCND3 expressziójának mértéke fontos szerepet játszik különböző daganatok kialakulásában (65,66), továbbá egyes adatok arra utalnak, hogy fontos faktor lehet a felszínen terjedő melanomák klinikai viselkedésének megjósolásában (67).

A 7-es kromoszóma eltérései malignus melanomában eddigi ismerteink szerint rossz prognózissal társulnak, és mivel számos eltéréssel asszociálódva jelennek meg

feltételezhető, hogy a daganatprogresszió késői szakaszára jellemzőek (32). Array-CGH vizsgálataink szerint jelentős számú amplifikálódott DNS szekvencia található a 7-es kromoszómán, melyek leggyakrabban a 7q31-q36 közötti DNS szakaszok alterációit foglalják magukban. Napjainkban ismerték fel, hogy az ezen a szakaszon lokalizálódó *braf* onkogén mutációja, ami gyakran a gén kismértékű amplifikációját jelenti, a melanomák kétharmadában kimutatható, ugyanakkor a mutáció a szem pigmentsejtes daganatában nem detektálható (68). A sejtvonalban a 7-es kromoszóma eltérése nemcsak számbeli eltérést és DNS többletet, hanem strukturális eltérést is jelent. SKY-FISH-sel a 7-es és 17-es kromoszómák között transzlokációt figyeltünk meg, mindkét 17-es kromoszóma rövidkarjára a 7-es kromoszómáról egy-egy DNS-darab transzlokálódott. A transzlokáció érinthette a 7q34-es szakaszt is, hiszen mind az eredeti, mind a sejtvonal CGH analízise a 7q22-pter régió jelentős mértékű DNS-többletet mutatott. Ennek bizonyítása sávspecifikus DNS-szondával oldható meg. A 7p12 lókuszon lokalizálódó *egf-r* gén, melyről feltételezik, hogy fontos szerepe van a melanoma metasztázisok kialakulásában, az általunk alkalmazott módszerekkel a sejtvonalban nem mutatott eltérést (24).

A melanomák progressziójában valószínűleg szerepet játszó lókuszek közül a 9p21 a legintenzívebben tanulmányozott. Ezen a lókuszon lokalizálódik a ciklin-dependens kináz inhibitor 2A (*p16/cdkn2/ink4/mts1*) és 2B gén (*ink4b/mts2/p15*), melyek szerepe familiáris melanomákban már régóta ismert (69). A sejtvonalban a kromoszómális CGH adatok szerint a 9-es kromoszóma jelentős része deléciót mutatott, ugyanakkor az array-CGH szerint a deléció a 9q szakaszra nagyobb mértékben terjedt ki. FISH-sel 9p21 lókuszs-specifikus szondával 2 szignált találtunk, ami a centoméra számhoz képest a lókuszon deléciót jelent. A 9p21-es lókuszt alterációja, ami melanomákban legtöbbször a *p16*-os gén aberrációját jelenti, sok esetben a gén pontmutációját, vagy kisebb DNS-szekvenciák elvesztését, ill. promóter metilációt foglal magában. Primer melanomák CGH analízisét követően teljes 9-es kromoszómavesztésről Bastian és mtsai. is beszámoltak, és a tumorigenezis korai lépéseivel hozták kapcsolatba (52). Ez utóbbit olyan vizsgálatok is alátámasztották, melyek diszplasztikus névuszokban mutatták ki nagy gyakorisággal a 9-es kromoszóma vesztést (70).

További, melanomákra jellemző kromoszómális eltérésnek számít a 10-es kromoszóma deléciója, ami feltételezhetően a 9-es kromoszómához hasonlóan a progresszió korai szakaszában következik be. LOH vizsgálatokkal primer melanomák 30-50%-ában találtak 10q deléciót, főként vékony tumorokban (14). A 10q23.3 régió mutációját számos daganatban kimutatták, később kiderült, hogy ezen a lókuszon helyezkedik el a Cowden

betegségben kialakuló különféle daganatok progressziójában szerepet játszó *pten/mmac1* tumorszuppresszor gén (71). Melanoma sejtvonalak több mint 40 %-ában a gént vagy nem tudták kimutatni, vagy a génben mutációt detektáltak (71). A *pten/mmac1* hibás működése a szintén *crista neuralis* eredetű gliomákban is megfigyelhető (72,73).

Bastian és mtsai. melanoma altípusok genetikai eltéréseit hasonlították össze CGH-el és megfigyelték, hogy a felszínen terjedő és a lentigo maligna melanoma altípusoknál, melyek a krónikus napsugárzásnak kitett testfelületeken gyakrabban alakulnak ki, a 13q és 17p régió eltérései sokkal gyakoribbak (74). A 17p deléció mind a primer melanómában, mind az M35/01 sejtvonalban CGH-el a közös eltérések között szerepelt, és összefüggésben állhat a 17p lókuszon elhelyezkedő, a DNS-hibajavításban alapvető szerepet játszó *p53* gén mutációjával. SKY-FISH-sel a 13-as kromoszómán többszörös transzlokációt figyeltünk meg, ami a 21-es és az Y kromoszómát is érintette. Schulten és mtsai. többszínű-FISH-sel és sávozással hét melanoma sejtvonalból négyenél a 13-as kromoszómát is érintő összetett átrendeződést mutattak ki (75). A 13-as kromoszóma transzlokációja mind a négy sejtvonalnál más-más kromoszómát érintett, ami a 13-as kromoszóma magas transzlokációs hajlamára hívja fel a figyelmet.

Az eredeti tumorban és a sejtvonalban a legnagyobb mértékű amplifikációt a 15-ös kromoszómán figyeltük meg mind kromoszómális, mind array-CGH-el. Interfázis FISH-sel a sejtvonal sejteinek 81 %-a a 15-ös kromoszómára tetraszómiás volt. A kromoszóma számbeli eltérése strukturális átrendeződéssel is társult, a transzlokációban a 2-es és 6-os kromoszóma is részt vett. Az array-CGH adatok alapján figyeltünk fel a 15q15 szekvencia amplifikációjára. Ezen a lókuszon már több gént azonosítottak, de melanoma-progresszióhoz rendelhető elváltozást viszonylag keveset írtak le. Hasonlóan az M35/01 sejtvonalhoz, többen a 15-ös kromoszóma strukturális eltérését figyelték meg, érdekes módon Guan és mtsai. ugyancsak a 6-os 15-ös kromoszómák transzlokációját találták (76). A 15q15-ös lókuszon lokalizálódó gének közül részletesen elemezték a *trombospodin-1* (*tsp1*) gént, melynek terméke az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódik és számos biológiai folyamat szabályozásában játszik szerepet. A melanómákban változatos expressziót mutató *tsp1* fokozott strómális expressziója rossz prognózissal társul (77). Fontos szerepe lehet még a 15q15-q21 lokalizációjú fibroblaszt növekedési faktor 7 (*fgf7: keratinocyte growth factor*) génalterációjának is, azonban a gén melanoma-progresszióban betöltött szerepe ma még ismeretlen (78).

Mind a primer tumorban, mind a sejtvonalban megfigyeltük a 16-os kromoszóma eltéréseit, aminek jelentőségét az ezen a kromoszómán lokalizálódó E-cadherint kódoló

gén (16q22) adja. Normál humán bőrben az E-cadherin valamennyi epidermális sejt (keratinociták, melanociták, Langerhans-sejtek) felszínén expresszálódik, a P-cadherin csak a bazális réteg keratinocitáin, az N-cadherin pedig fibroblasztok és endotél sejtek felszínén fejeződik ki. Herlyn és mtsai. a melanoma kialakulása során a cadherin-expresszió megváltozására hívták fel a figyelmet (4). Kimutatták, hogy a keratinociták közvetlen sejt-sejt interakción keresztül szabályozzák a melanociták proliferációját. A szabályzás szempontjából az E-cadherin mediált adhézió kritikusanak tűnt a két sejt-típus között. Ezzel ellentétben a keratinociták növekedésgátlása a melanomasejtekre nem volt hatással, feltételezhetően a kontakt-mediált szabályozás elvesztése miatt. Egy másik *in vitro* modellben az E-cadherin sejt-felszíni expressziója meggátolta a melanomasejtek invázióját a dermiszbe a folyamatban fontos szerepet játszó adhéziós receptorok, a Mel-CAM és a β_3 integrin alegység, down-regulációja által (79). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a melanociták kiszabadulása a keratinociták E-cadherin-regulált kontrollja alól fontos esemény lehet a melanomagenézisben.

A 19-es kromoszóma SKY-FISH-sel kimutatott strukturális átrendeződése mellett, mind kromoszómális, mind array-CGH-el ezen a kromoszómán DNS többletet mutattunk ki. A strukturális átrendeződés a 19-es kromoszóma rövidkarjának centoméra közeli régióját érintette, ahova a 22-es kromoszóma egy szakasza épült be. A 22-es kromoszóma transzlokációja a 19p13-as lókuszt közelében az ott elhelyezkedő gének (mint pl. a nukleáris stabilitás és a kromatin struktúra fenntartásában, valamint a génexpresszió szabályozásában résztvevő lamin B2 (19p13) gén) normál funkcióját megzavarhatja, és így hozzájárulhat a sejtmag szerkezetének destabilizálásához és a kromatin szerkezet megsemmisítéséhez.

A 19-es kromoszómához hasonlóan a 20-as kromoszómán is DNS többletet detektáltunk CGH-el, ez a SKY-FISH alapján négy 20-as kromoszómát jelentett: két, feltételezhetően normál 20-as kromoszóma mellett, két további valószínűleg izokromoszómális átrendeződés eredményeként létrejött 20-as kromoszómát is megfigyeltünk. Extra 20-as kromoszóma melanoma sejtvonalakban és natív tumorok genomjában nem ritka jelenség. A 20q amplifikációt Barks és mtsai. több melanoma sejtvonalban megfigyelték CGH-el (80). A 20-as kromoszómán kódolt gének közül a normál fiziológiai folyamatokban, például az embrionális fejlődés, a reprodukció, vagy a szövetek újjáépülése során, az extracelluláris mátrix lebontásában szerepet játszó mátrix metalloproteináz protein (MMP) családdhoz tartozó gén szerepe vetődik fel (MMP-9, 20q11-q13). Melanomáknál különböző MMP-k emelkedett expresszóját figyelték meg az

invazív fenotípussal összefüggésben. Előrehaladott stádiumú melanoma sejtvonalakban kimutatták az MMP-9 expresszióját, míg korai stádiumú daganatokból létrehozott sejtvonalaknál ez nem volt lehetséges (81). A jelentős MMP-9 expressziót mutató humán melanoma sejtvonal egerekbe oltva tüdőmetasztázis kialakulásához vezetett.

Melanomák genetikai eltéréseinek elemzése során gyakran felfigyeltek teljes kromoszómák, kromoszóma szegmensek, és tumorszuppresszor gének elvesztésére (14,24,74). Az új melanoma sejtvonal FISH és SKY-FISH analízisének eredményei arra utalnak, hogy az M35/01 sejtvonal genomjára a relatív kromoszómavesztések jellemzőek. Feltételezésünk szerint a primer daganatsejtekben a tumorprogresszió korai stádiumában a teljes genom megtöbbszöröződése következett be, majd az így kialakult tetraploid sejtvonalból először teljes kromoszómák veszttek el, mely a 9-es, 10-es, 16-os és 18-as kromoszómákat érintette, ezekből a kromoszómákból a sejtvonalban FISH módszerrel csak két-két kópiát tudtunk kimutatni. CGH-el az említett kromoszómák mellett más kromoszómaszakaszok hiányát is megfigyeltük.

A kromoszóma szintű eltérésekkel szemben azokra a génekre, melyekről feltételeztük, hogy génszintű eltérések hozzájárulnak a melanoma progresszióhoz, FISH-sel nem találtunk a centromérához viszonyított eltérést. Mindez arra utal, hogy a primer tumor progressziója során a kromoszómák megtöbbszöröződése (*aneuploidia*) a korai elváltozások közé tartozott. A daganatok kialakulásában szerepet játszó genetikai mutációk szerepére Tyzzer már 1916-ban utalt (82), azonban még ma sem egyértelmű, hogy a tumorigenezisben a nagyobb genomszakaszok aneuploidiajának, azaz a kromoszómaegyensúly felborulásának, vagy a génmutációk létrejöttének van-e elsődleges szerepe. Az aneuploidia-hipotézis szerint a daganatkeletkezésnek három fő lépése van, az első lépésben a karcinogének a kromoszómák megtöbbszöröződését eredményezik, ami a genom destabilizációjához vezet, ezt követően preneoplasztikus, majd végül neoplasztikus kariotípus alakul ki (83). Mivel annak valószínűsége, hogy egy újonnan keletkező aneuploid sejt életképesebb legyen, mint egy diploid sejt, igen alacsony, a neoplasztikus sejtek evolúciója lassú és klonális folyamat. A daganatra jellemző genetikai eltérések, a daganatok túlnyomó többségénél, az egyedi daganatsejtek szintjén meglévő számos génamplifikációt és deléciót tükrözik. Gyakorlatilag ez a rendkívüli heterogenitás akadályozza meg a sikeres daganatellenes terápiát is (83).

Az M35/01 melanoma sejtvonalban felismert genetikai eltérések számos, a felszínen terjedő altípusra jellemző, irodalomban is közölt eltérést foglalnak magukban, így az új sejtvonal alkalmas ennek a daganattípusnak különböző körülmények közötti *in vitro*

tanulmányozására is. A sejtvonal jelentőségét tovább emeli, hogy kromoszómális CGH-el sikerült kimutatni, hogy az *in vitro* körülmények között fenntartott sejtek eltéréseinek jelentős része már a primer tumorban is jelen volt.

6.3 Primer melanomák és melanoma metasztázisok cDNS alapú array-CGH vizsgálata

A cDNS alapú array analízissel célunk annak tanulmányozása, hogy a génszinten felismert eltérések milyen génexpressziós szint változásokkal társulnak. Dolgozatomban azokról a vizsgálatokról számolok be, melyek célja a cDNS alapú array-CGH hibridizáció melanomákra történő adaptálása volt. Vizsgálatainkat a jövőben expressziós array analízisekkel tervezzük kiterjeszteni.

A cDNS-fragmenteket tartalmazó chippek előnye, hogy a mRNS-ként megjelenő DNS szekvenciák eltéréseit jelenítik meg (84). Bár a cDNS-chipen alapuló CGH-módszer a kisméretű, génen belüli mutációk felismerésére nem alkalmas, mégis új megoldást jelent a normálsejt kontamináció zavaró hatásának kiküszöbölésére, mivel mindössze egy génkópiányi változás kimutatását is lehetővé teszi olyan mintából, melynek akár 60 %-át is normál sejtek alkotják (85). A jelentős mennyiségű információt tartalmazó adatbázisok segítségével a kísérletekben azonosított gének kromoszómális elhelyezkedése könnyen meghatározható.

cDNS alapú array-CGH módszerrel eddig 9 daganat (4 betegből a primer és metasztatikus tumor ugyanabból a betegből származott) hibridizációját és analízisét végeztük el sikeresen. Az alkalmazott chip több mint 12000 cDNS fragmentet tartalmazott. Mivel a primer tumor és a metasztázisa közötti genetikai különbségek megállapítására igen hatékony módszer, ha referencia DNS-nek a primer tumor genomját tekintjük, ezért 3 mintapárnál ezt a kísérleti megközelítést alkalmaztuk. Megfigyeléseink szerint azoknak a cDNS elemeknek a száma, melyek csak a metasztázisokban amplifikálódnak vagy deletálódnak, az eddig vizsgált 3 betegnél eltérőek. A legkevesebb eltérést annál a tumorpárnál találtuk, amelyiknél a primer tumor a TNM besorolás alapján a legelőrehaladottabb stádiumú volt (T4bN2M0). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a primer tumorban a genetikai eltérések olyan mértékű halmozódása alakult ki, melyhez már kisszámú új eltérés létrejötte is elegendő volt, hogy a metasztázis makroszkóposan is megfigyelhetővé váljon (86). Abban az esetben, ha referens DNS-ként normál DNS-t használtunk, a primer tumorban több mint hatszáz cDNS elem amplifikácót, és hasonló számú elem deléciót figyeltünk meg. Az ugyanebből a betegből származó

metasztázisban mind a deletált, mind az amplifikált cDNS-fragmentek száma közel megduplázódott. Ezek a daganatok egy fiatal betegből származtak, és a primer tumor a TNM beosztás alapján előrehaladott stádiumú volt. Ezek a megfigyelések is alátámasztják azokat a kromoszómális CGH-el kapott eredményeinket, melyek szerint a genetikai aberrációk fokozatos akkumulációja összefügg, illetve arányos a melanoma agresszivitásával (24).

A primer tumorok cDNS alapú array-CGH eredményeinek összehasonlítása során 58 olyan ismert gént találtunk, melyek minden mintában deletálva (31 gén), illetve minden mintában amplifikálva (27 gén) voltak. Érdeemes kiemelni a Rho családba tartozó „*Rho GTPase-activating protein*” gént, melyről kiderült, hogy csökkent mértékű kifejeződése összhangban állhat a gén részleges, vagy teljes deléciójával (87). Irodalmi adatok szerint a Rho fehérjék fontos szerepet játszanak a daganatok kialakulásában és a család különböző tagjai a tumorprogresszió különböző szakaszaiban, így a metastázis képzésben is közreműködnek. Melanoma sejtvonalak metastázisképző tulajdonságának szisztematikus analízise során Clark és mtsai. figyeltek fel arra, hogy a *Rho C* gén alterációja megnöveli a melanoma sejtek motilitását és a kevésbé metastatikus sejtek invazív tulajdonságát (88). A cDNS alapú array-CGH vizsgálataink ezt a megfigyelést alátámasztják.

cDNS alapú array-CGH vizsgálatot melanomákon eddig még nem végeztek, BAC alapú array-CGH eredményeket melanomán pedig egyedül Harvell és mtsai. közöltek (89). Ez utóbbi munkában a tapasztalt bőrgyógyász-onkológus számára is nehezen megkülönböztethető Spitz névuszt és a melanomát hasonlították össze formalin fixált, parafinba ágyazott szövetekből származó DNS-minták segítségével, és kimutatták, hogy a kromoszómális CGH-nél érzékenyebb array-CGH-el a Spitz névusz elkülöníthető a melanomától.

Dolgozatomban megpróbáltam rávilágítani a melanomákban kialakuló rendkívüli mértékű genetikai heterogenitás jelenségére, a heterogenitás feltérképezéséhez szükséges többféle módszer együttes használatának fontosságára, és arra, hogy még számos, eddig még nem, vagy csak kevésbé vizsgált potenciális onkogén és tumorszuppresszor gén melanoma-progresszióban betöltött szerepének tanulmányozása a jövőbeli kutatások célja lehet.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban szereplő vizsgálatok fő célja a különböző biológiai viselkedésű malignus melanoma altípusok progressziójában szerepet játszó genetikai eltérések tanulmányozása volt *in situ* hibridizációs módszerek segítségével.

1. Interfázisos FISH analízissel kimutattuk, hogy primer melanomák és melanoma metasztázisok genetikailag heterogén sejtpopulációkat tartalmaznak.
2. A biológiai viselkedés szempontjából elkülönülő noduláris és felszínen terjedő melanomák között az alábbi kromoszóma eltéréseket figyeltük meg:
 - A 7-es kromoszóma kivételével, a felszínen terjedő melanomákban jelentős számban fordult elő monoszómiás sejtpopuláció.
 - Az 1-es, 3-as, 6-os, 7-es és 8-as kromoszómák poliszómiája a noduláris altípusban gyakoribb volt.
 - A 6-os kromoszóma poliszómiáját szignifikánsan több noduláris melanomában mutattuk ki.
 - A 9-es kromoszóma vesztést a szuperficiális altípusban, a 10-es kromoszóma egyik centromerájának delécióját a noduláris altípusban figyeltük meg gyakrabban.
3. Megállapítottuk, hogy a CGH-el korábban felismert 8q22-qter DNS többlet összefügg a *c-myc* onkogén kópiaszámának növekedésével. Jelentős mértékű *c-myc* amplifikációt csak a rosszabb prognózisú noduláris melanomákban tudunk kimutatni.
4. A *c-myc* gén amplifikációja és a daganatok klinikopatológiai paraméterei között az alábbi összefüggéseket találtuk:
 - A törzsön, illetve a fej-nyaki régió elhelyezkedő daganatok közül szignifikánsan több noduláris melanománál mutattunk ki *c-myc* amplifikációt, mint a végtagokon elhelyezkedő lézióknál ($p=0,004$).
 - A noduláris melanomák között az extra *c-myc* kópiát tartalmazó kifelékélyesedett tumorok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a felszínen terjedő daganatoknál ($p=0,01$).
 - A nyirokcsomó metasztázist képző noduláris melanomák között szignifikánsan több daganat mutatott *c-myc* gén kópiaszám emelkedést, összehasonlítva az ugyanebbe a csoportba tartozó felszínen terjedő daganatokkal ($p=0,04$).
 - Azoknál a betegeknél, akik a primer tumor eltávolítását követően 5 éven belül meghaltak, a *c-myc* gén kópiaszám emelkedés gyakoribb volt a noduláris melanomákban, összehasonlítva az ugyanebbe a csoportba tartozó felszínen terjedő daganatokkal ($p=0,02$).

5. A felszínen terjedő melanomából származtatott új sejtvonal genetikai elemzése során megállapítottuk:
- A sejtvonal és az eredeti tumor eltéréseinek többsége a CGH profilok alapján megegyezett, ami arra utal, hogy a sejtvonal genetikai elváltozásai domináltak az eredeti tumorban is.
 - Az M35/01 sejtvonal kariotípusa komplex, a kromoszómák számbeli eltérései mellett számos strukturális eltérés is jellemezte.
 - A sejtvonal analízise centroméra- és gén-specifikus szondákkal felveti az aneuploidia szerepének fokozott fontosságát a daganatprogresszió során a génamplifikációval/delációval szemben.
 - Az új melanoma sejtvonal genetikai elemzése bizonyítja, hogy a különböző szintű genetikai eltérések felismerése több módszer párhuzamos alkalmazását igényli.
6. A BAC (genomiális DNS szekvencia) és cDNS array alapú komparatív genom hibridizációs módszerekkel a kromoszómális CGH-hez képest pontosabban meghatározható az amplifikált és deletált szekvenciák lokalizációja. cDNS array-el lehetővé válik a genetikai eltérések és a génexpresszió párhuzamos analízise ugyanazon a chipen.
- Az array-CGH alapján a sejtvonalban a legnagyobb mértékű amplifikációt ($\text{Log}_2 > 0,6$) a 7q (7q22-q31), 15q (15q21-q25), 20q (20q13) kromoszómakarokon, a legnagyobb mértékű deléciót ($\text{Log}_2 < -0,6$) a 4q (4q12, 4q28-q31, 4q32-q33), 9p (9p21, 9p23, 9p24), 9q (9q21), 10q (10q23-q25), 12q (24.3), 16q (16q13-q21, 16q21, 16q23) 18p (18p11, 18q21-23), 17p (17p12) kromoszómaszakaszokon figyeltük meg.
 - A primer tumorok array-CGH eredményeinek összehasonlításakor 58 olyan ismert gént találtunk, melyek minden mintában deletálva (31 gén), illetve minden mintában amplifikálva (27 gén) voltak.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Mancianti ML, Herlyn M. Tumor progression in melanoma: the biology of epidermal melanocytes in vitro. *Carcinog Compr Surv.* 1989;11:369–386.
2. Allen AC, Spitz S. Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer.* 1953;6(1):1–45.
3. Gershenwald JE, Buzaid AC, Ross MI. Classification and staging of melanoma. *Clin Lab Med.* 2000;20(4):785–815.
4. Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorthy K. Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res.* 2000;10(4):303–312.
5. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene.* 2003;22(20):3042–3052.
6. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953–1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer.* 2003;107(1):119–126.
7. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *B J Dermatol.* 2004;150:179:185.
8. Cutler SJ, Young JL Jr. Third National Cancer Survey: Incidence Data Natl Canc Inst, Monogr 1995;41.
9. Setlow RB, Woodhead AD, Grist E. Animal model for ultraviolet radiation-induced melanoma: platyfish–swordtail hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:8922–8926.
10. Ley RD, Applegate LA, Padilla RS, Stuart TD. Ultraviolet radiation-induced malignant melanoma in *Monodelphis domestica*. *Photochem Photobiol.* 1989; 50(1):1–5.
11. Langley RB, Sober AJ. A clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma. *Cancer Invest.* 1997;15:561–567.
12. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, Mc Masters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(16):3635–3648.
13. Kelly JW, Chamberlain AJ, Staples MP, McAvoy B. Nodular melanoma. No longer as simple as ABC. *Aust Fam Physician.* 2003;32(9):706–709.
14. Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C. Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(9):1923–1932.

15. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med.* 1990;319:525-532.
16. Welch DR, Goldberg SF. Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. *Pathobiol.* 1997;65:311-330.
17. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nature Genet.* 1999;21:128-132.
18. Kumar R, Smeds J, Berggren P, Straume O, Rozell BL, Akslen LA, Hemminki K. A single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer.* 2001;95:388-393.
19. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1378:F115-F177.
20. Matsuyama H, Pan Y, Yoshihiro S, Kudren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P. Clinical significance of chromosome 8p, 10q, and 16q deletions in prostate cancer. *Prostate.* 2003;54(2):103-11.
21. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM Jr, Menon AG. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res.* 1995;55(20):4696-4701.
22. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene.* 1995;10(11):2243-2246.
23. Pollock PM, Trent JM. The genetics of cutaneous melanoma. *Clin Lab Med.* 2000;20(4):667-690.
24. 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.* 2001;46(4):222-232.
25. Attwell S, Mills J, Troussard A, Wu C, Dedhar S. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Cell.* 2003;14(12):4813-4825.
26. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar et. Al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 2002;62(23):6997-7000.
27. Saida T. Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci.* 2001;26(1):1-13.
28. Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, Meese EU, Casey G, Arango DE, Witkowski CM, Nagle RB. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science.* 1990;247:568-571.

29. Jiang H, Lin J, Su ZZ, Herlyn M, Kerbel RS, Weissman BE, Welch DR, Fisher PB. The melanoma differentiation-associated gene mda-6, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells. *Oncogene*. 1995;4;10(9):1855-1864.
30. Tomlinson IP, Beck NE, Bodmer WF. Allele loss on chromosome 11q and microsatellite instability in malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 1996;32A(10):1797-1802.
31. Herbst RA, Larson A, Weiss J, Cavenee WK, Hampton GM, Arden KC. A defined region of loss of heterozygosity at 11q23 in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res*. 1995;55(12):2494-2496.
32. Trent JM, Meyskens FL, Salmon SE, Ryschon K, Leong SPL, Davis JR, McGee DL. Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. *N Eng J Med*. 1990;322:1508-1511.
33. Eisen TG. The control of gene expression in melanocytes and melanomas. *Melanoma Res*. 1996;6(4):277-284.
34. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreeff M. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene*. 1989;4(11):1363-1374.
35. van 't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, Boot AJ, Ruiter DJ, Osanto S, Schrier PI, Bos JL. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol*. 1989;9(7):3114-3116.
36. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol*. 1994;102(3):285-290.
37. Rodeck U, Herlyn M. Growth factors in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 1991;10(2):89-101.
38. Bale SJ, Dracopoli NC, Tucker MA, Clark WH Jr, Fraser MC, Stanger BZ, Green P, Donis-Keller H, Housman DE, Greene MH. Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N Engl J Med*. 1989;320(21):1367-1372.
39. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(23):1731-1737.
40. Wolman SR, Waldman FM, Balazs M. Complementarity of interphase and metaphase chromosome analysis in human renal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1993;6(1):17-23.

41. Balázs M, Matsumura K, Moore D, Pinkel D, Gray JW, Waldman F. Karyotypic heterogeneity and its relation to labeling index in interphase breast tumor cells. *Cytometry*. 1995;20:62-73.
42. Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, Leiter U, Peter RU. Extra c-myc oncogene copies in high-risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. *Br J Cancer*. 2001;84:72-79.
43. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor Spectral Karyotyping of Human chromosomes. *Science*. 1996;273:494-497.
44. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258:818-821.
45. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207-11.
46. Monni O, Hyman E, Mousses S, Barlund M, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. From chromosomal alterations to target genes for therapy: integrating cytogenetic and functional genomic views of the breast cancer genome. *Semin Cancer Biol*. 2001;11(5):395-401.
47. Greulich KM, Utikal J, Peter RU, Krahn G. c-myc and nodular malignant melanoma. A case report. *Cancer*. 2000;89:97-103.
48. Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, Papadopoulos N. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1998;16(5):1752-1759.
49. Kageshita T, Hamby CV, Hirai S, Kimura T, Ono T, Ferrone S. Differential clinical significance of alpha(v)Beta(3) expression in primary lesions of acral lentiginous melanoma and of other melanoma histotypes. *Int J Cancer*. 2000;89(2):153-159.
50. Healy E, Rehman I, Angus B, Rees JL. Loss of heterozygosity in sporadic primary cutaneous melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995;12:152-156.
51. Thompson FH, Emerson J, Olson S, Weinstein R, Leavitt SA, Leong SP, Emerson S, Trent JM, Nelason MA, Salmon SE. Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma: subset analysis of near-diploid and simple karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;83:93-104.
52. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1998;58(10):2170-2175.

53. Chana JS, Grover R, Tulley P, Lohrer H, Sanders R, Grobbelaar AO, Wilson GD. The c-myc oncogene: use of a biological prognostic marker as a potential target for gene therapy in melanoma. *Br J Plast Surg.* 2002;55(8):623-627.
54. Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C, Trent J. Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1991;51(20):5449-5453.
55. Welch DR, Chen P, Miele ME, McGary CT, Bower JM, Stanbridge EJ, Weissman BE. Microcell-mediated transfer of chromosome 6 into metastatic human C8161 melanoma cells suppresses metastasis but does not inhibit tumorigenicity. *Oncogene.* 1994;9(1):255-262.
56. Treszl A, Ádány R, Rákossy Zs, Kardos L, Bégány Á, Gilde K, Balázs M. Extra copies of c-myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry.* 2004;60B(1):37-46.
57. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene.* 2003;22(20):3081-3086.
58. Driouch K, Champeme MH, Beuzelin M, Bieche I, Lidereau R. Classical gene amplifications in human breast cancer are not associated with distant solid metastases. *Br J Cancer.* 1997;76:784-787.
59. Watson PH, Safneck JR, Le K, Dubik D, Shiu RP. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumour and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:902-907.
60. Ross DA, Wilson GD. Expression of c-myc oncoprotein represents a new prognostic marker in cutaneous melanoma. *Br J Surg.* 1998;85:46-51.
61. Grover R, Ross DA, Wilson GD, Sanders R. Measurement of c-myc oncoprotein provides an independent prognostic marker for regional metastatic melanoma. *Br J Plast Surg.* 1997;50:478-482.
62. Boni R, Bantschapp O, Muller B, Burg G. c-myc is not useful as prognostic immunohistochemical marker in cutaneous melanoma. *Dermatology.* 1998;196:288-291.
63. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1301-1308.
64. Snijders AM, Pinkel D, Albertson DG. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2003;2(1):37-45.
65. Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Pathol.* 2001;194(1):35-42.

66. Yu J, Miehlike S, Ebert MP, Szokodi D, Wehvnignh B, Malfertheiner P, Ehninger G, Bayerdoerffer E. Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin Med J (Engl)*. 2002;115(5):710-715.
67. Vivi Ann Florenes, Ragnar S. Faye, Gunhild M. Mælandsmo, Jahn M. Nesland and Ruth Holm. Levels of Cyclin D1 and D3 in Malignant Melanoma: Deregulated Cyclin D3 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcome in Superficial Melanoma *Clinical Cancer Research*. 2000;6:3614-3620.
68. Edmunds SC, Cree IA, Di Nicolantonio F, Hungerford JL, Hurren JS, Kelsell DP. Absence of BRAF gene mutations in uveal melanomas in contrast to cutaneous melanomas. *Brit. J. Cancer*. 2003;88:1403-1405.
69. Petty EM, Bolognia JL, Bale AE, Yang-Feng T. Cutaneous malignant melanoma and atypical moles associated with a constitutional rearrangement of chromosomes 5 and 9. *Am. J. Med. Genet*. 1993;45:77-80.
70. Cowan JM, Halaban R, Francke U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80(14):1159-64.
71. Guldborg P, Straten P, Brick A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zenthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res*. 1997;57:3660-3663.
72. Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res*. 2003;9(9):3369-75.
73. Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Nakamura H, Hirano H, Kuratsu J, Kochi M, Saya H, Ushio Y. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *J Neurosurg*. 2001;95(4):651-659.
74. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol*. 2003;163(5):1765-1770.
75. Schulten HJ, Gunawan B, Otto F, Hassmann R, Hallermann C, Noebel A, Fuzesi L. Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;133(2):134-141.
76. Guan XY, Zhang HE, Zhou H, Sham JS, Fung JM, Trent JM. Characterization of a complex chromosome rearrangement involving 6q in a melanoma cell line by chromosome microdissection. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;134(1):65-70.
77. Trotter MJ, Colwell R, Tron VA. Thrombospondin-1 and cutaneous melanoma. *J Cutan Med Surg*. 2003;7(2):136-41.
78. Wetner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg, Hofschneider PH, Williams LT. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 1994;266:819-822.

79. Hsu MY, Shih DT, Meier FE, Van Belle P, Hsu JY, Elder DE, Buck CA, Herlyn M. Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am J Pathol.* 1998;153(5):1435-42.
80. Barks JH, Thompson FH, Taetle R, Yang JM, Stone JF, Wymer JA, Khavari R, Guan XY, Trent JM, Pinkel D, Nelson MA. Increased chromosome 20 copy number detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;19(4):278-85.
81. MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS. The 92-kD gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res.* 1995;55:4174-4181.
82. Tyzzer EEJ. Tumor immunity. *J Cancer Res.* 1916;1:125-155.
83. Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 2000;47:81-107.
84. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12963-12968.
85. Hodgson G, Hager JH, Volik S, et al. Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat Genet.* 2001;29(4):459-464.
86. Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 1997;57(8):1597-1604.
87. Wang L, Yang L, Luo Y, Zheng Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44617-44625.
88. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 2000;406(6795):532-535.
89. Harvell JD, Kohler S, Zhu S, Hernandez-Boussard T, Pollack JR, van de Rijn M. High-resolution array-based comparative genomic hybridization for distinguishing paraffin-embedded Spitz nevi and melanomas. *Diagn Mol Pathol.* 2004;13(1):22-5.

9. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

9.1. Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

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

IF: 2,557

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

IF: 2,095

Treszl A., Rákósy Zs., Ladányi A., Ádány R., Balázs M.: Complex cytogenetic analysis of a new metastatic melanoma cell line.
(közlésre elküldve)

9.2. Egyéb *in extenso* közlemények és indézhető absztraktok

Toida M., Balázs M., **Treszl A.**, Rákósy Zs., Kato K., Yamazaki Y., Matsui T., Suwa T., Hatakeyama D., Makita H., Mori S., Yamashita T., Shibata T., Ádány R.: Analyses of Ameloblastomas by Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence in situ Hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2004 (közlésre elfogadva)

IF: 1,542

Méhes L., Balázs M., **Treszl A.**, Rejtő L., Telek B., Kiss A., Udvardy M.: Cytogenetic aberrations in familial chronic lymphocytic leukaemia: a report of two siblings. (közlésre elküldve)

Balázs M., Ádám Zs., Bégány Á., **Treszl A.**, Hunyadi J., Ádány R.: Chromosomal copy number changes in primary and metastatic melanomas detected by CGH and FISH. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. 2000. No. 2670. p420.

Balázs M., **Treszl A.**, Bégány Á., Ádány R.: Frequent amplification of c-myc oncogene in nodular malignant melanomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Onkologia* 4. Suppl. 1. 2002.

Balázs M., **Treszl A.**, Ádány R.: Application of fluorescence in situ hybridisation in tumour diagnostics. *Cytometry*. 2003;56A:121-122.

Barok M., Szincsik N., **Treszl A.**, Balázs M., Vereb Gy., Szöllősi J.: Analysis of a Herceptin[®] resistant breast cancer cell line in SCID mice. *Cytometry*. 2003;56A:127.

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

9.3. Előadások és poszterek

Treszl A. (1999): Primer és metasztatikus melanomák interfázisos analízise. Országos Tudományos Diáktalálkozó, Kossuth Lajos Tudományegyetem, Debrecen

Balázs M., Ádám Zs., Bégány Á., **Treszl A.**, Hunyadi J., Ádány R. (2000): Chromosomal copy number changes in primary and metastatic melanomas detected by CGH and FISH. Conference of the American Association for Cancer Research, San Francisco, USA

Treszl A., Balázs M., Bégány Á., Ádány R. (2000): Frequent chromosome 8 copy number alterations in malignant melanomas detected by FISH. XVI Conference of the European Association for Cancer Research, Halkidiki, Görögország

Treszl A. (2001): A 8-as kromoszóma karakterizálása primer és metasztatikus human melanomákban. Országos Tudományos Diáktalálkozó, Pécsi Tudományegyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Pécs, 1. helyezés

Balázs M., **Treszl A.**, Ádány R. (2002): A fluoreszcencia in situ hibridizáció alkalmazási lehetőségei a tumor diagnosztikában. III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest

Barok M., Szincskák N., **Treszl A.**, Balázs M., Vereb Gy., Szöllősi J. (2002): Egy Herceptin-rezisztens emlődaganat-sejtvonal analízise. III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest

Balázs M., **Treszl A.**, Bégány Á., Ádány R. (2002): Frequent amplification of c-myc oncogene in nodular malignant melanomas detected by fluorescence in situ hybridisation. XVII Conference of the European Association for Cancer Research, Granada, Spanyolország

Treszl A., Ladányi A., Rákosy Zs., Buczkó Zs., Ádány R., Balázs M. (2003): Establishment and cytogenetic characterization of a new melanoma cell line by CGH and FISH. 3rd EUROS KIN Conference, Stockholm, Svédország

Rákosy Zs., **Treszl A.**, Bégány Á., Ádány R., Balázs M. (2004): Az EGFR gén (7p12) amplifikáció szerepének tanulmányozása primer melanomák metasztázisképzésében. IV. Sejtanalitikai Konferencia, Budapest

Barok M., Juhász I., **Treszl A.**, Balázs M., Park J.W., Isola J., Fazekas Zs., Vereb Gy., Szöllősi J. (2004): Mikrometasztázisok kimutatása Herceptin[®] rezisztens és érzékeny emlőrák xenograftokban. IV. Sejtanalitikai Konferencia, Budapest

Balázs M., Rákosy Zs., **Treszl A.**, Bégány Á., Ádány R. (2004): Interphase cytogenetic analysis shows frequent hemizygous and homozygous deletions of p16/MTS1/CDKN2A tumoursuppressor gene in sporadic primary melanomas. XXII International Congress of the International Society for Analytical Cytology (ISAC), Montpellier, Franciaország

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

Barok M., Juhász I., **Treszl A.**, Balázs M., Park J. W., Isola J., Fazekas Zs., Vereb Gy., Szöllősi J. (2004): Detection of circulating micrometastasis in Herceptin[®] resistant breast cancer xenograft. XVIII Conference of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Ausztria

Molnár Zs., **Treszl A.**, Kovács T., Jakab A. (2004): Aneuploid spermiumok előfordulása, kimutatása és reprodukciós jelentősége. Magyar Urológusok Társasága Andrológiai Szekciójának 28. Tudományos Ülése, Szeged

KÖSZÖNET

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

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

Köszönöm Dr. Bégány Ágnesnek a melanoma szövettanának és klinikumának k megismerésében nyújtott segítséget.

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

Szeretnék köszönetet mondani valamennyi TDK-hallgatónknak és külön köszönöm Rákosi Zsuzsa Ph.D. hallgatónk áldozatos munkáját.

Köszönöm férjem és családom támogatását és türelmét.

11. MELLÉKLETEK

**A DOLGOZAT ÖSSZEFOGLALÓ TÉZISEIT MEGALAPOZÓ
KÖZLEMÉNYEK**