

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

---

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

**TRESZL ANDREA**

---

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

**DEBRECEN, 2004.**

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

TRESZL ANDREA

**Témavezető:** Dr. Balázs Margit

**Programvezető:** Prof. Dr. Ádány Róza

## 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 múltat tekint vissza, és bár az utóbbi évtizedben a fejlődés látványosan felgyorsult és fontos felfedezések láttak napvilágot, melyek haszna ma már a klinikai gyakorlatban is megnyilvánul (pl. *erb2*-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 ötéves 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 predisponáló 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 megemelkedett.

A melanoma kialakulásában és progressziójában 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 hátterében álló genetikai eltérések megismerése hosszú 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 jelentőségűek 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 paraméterekkel 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.

## CÉLKITŰZÉSEK

### *A Ph.D. dolgozatot megalapozó kísérletes munka célkitűzései*

#### *1. Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák interfázisos FISH analízise kromoszóma centoméra- 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 régión lokalizálódó c-myc onkogén szerepének részletes vizsgálata felszínen terjedő és noduláris melanoma altípusokban és azok metasztázisaiban.
- Az aneuploidia, valamint a c-myc onkogén számbeli eltérései és a primer tumorok klinikopatológiai paraméterei közötti kapcsolat elemzése.

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

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

#### *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.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 1. Melanoma szövetminták

A humán melanoma szöveteket a Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum Bőrgyógyászati Klinikájáról és az Országos Onkológiai Intézet Bőrgyógyászati Klinikájáról 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.

## 2. Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

FISH vizsgálatainkhoz centroméra-, lókuszt-specifikus, valamint teljes kromoszómafestő DNS-szondákat alkalmaztunk. A DNS-szondák jelzése direkt, vagy indirekt jelzett nukleotidokkal, nick-transzlációval történt. A FISH-t az irodalomban leírt protokoll alapján, kisebb módosítások alkalmazásával végeztük. Röviden: a tárgylemezen rögzített, fixált sejtmagokat és kromoszómapreparátumokat denaturáló oldatban 75°C-on 2,5-5 percig denaturáltuk, a sejteket emelkedő koncentrációjú hideg etanolban dehidráltuk, majd levegőn megszáritottuk. 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 használtunk. A sejtmagok jelzésére antifade-ben oldott diamino-fenilindolt (DAPI), vagy propidium-jodidot alkalmaztunk.

A FISH eredményeket Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük (100× nagyítás (NA 1.3) olaj-immersziós objektív). A hibridizáció megbízhatóságának ellenőrzésére kísérleteinkben kontrollként egészséges egyén perifériás véréből preparált limfocitákat alkalmaztunk.

*Kromoszóma-index:* a kromoszóma-indexet (összes fluoreszcens szignál száma/megszámolt sejtmagok száma) tekintettük a kromoszóma kópiaszám kvantitatív mérőszámának. Egy adott mintát akkor tekintettünk poliszómiásnak, ha a megszámolt 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.

*A génamplifikáció definíciója:* a *c-myc* gén kópiaszámát a 8-as kromoszóma centromérához (C8) viszonyítva emelkedettnek tekintettük, ha az adott minta sejteinek >25%-ában extra *c-myc* kópiát találtunk. A 8-as centromérához viszonyított *c-myc* extra kópia-tartomány kiszámításához az  $x = \frac{\text{c-myc szignálok száma}}{\text{C8 szignálok száma}}$  (a vizsgált minta összes sejtjében) összefüggést alkalmaztuk. "Nem-amplifikáltak" azokat a mintákat tekintettük, ahol ez az arány  $< 1,5$ .

### **3. Spektrális kariotipus analízis (SKY-FISH)**

A spektrális kariotipizálást az irodalomban leírtak szerint a QBiogene Molecular Cytogenetics közreműködésével végeztük. Röviden: áramlási citométerrel szortírozott humán kromoszómákból polimeráz láncreakcióval előállított kromoszóma specifikus könyvtárak jelzése közvetlenül 5 különböző festékkel 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.

### **4. Komparatív genomiális hibridizáció**

#### **Kromoszómális CGH**

A DNS hibridizációt Kallioniemi és mtsai. által leírt módon végeztük, kisebb módosításokkal, az alábbiak szerint. A tumor és egészséges egyén



perifériás mononukleáris sejtjeiből származó normál DNS-t fenol:kloroform:izoamilalkohol oldattal extraháltuk proteináz-K kezelést követően, standard protokoll alapján. A tumor és normál DNS-t nick-transzlációval, direkt jelzett dUTP-vel jelöltük. A jelzett tumor vagy normál DNS-t és jelöletlen humán Cot-1 DNS-t tartalmazó DNS keveréket nátrium-acetáttal és etanollal kicsaptuk, megszártítottuk, majd hibridizációs oldatban feloldottuk. A denaturációt 73°C-on végeztük. A hibridizáció 37°C-on 72 órán át nedves kamrában történt. A hibridizációs lemezekről a nem hibridizálódott DNS-t hibridizáló-mosóoldat segítségével eltávolítottuk. A sejtmagokat antifade-oldatban oldott DAPI-val festettük. A CGH eredmények validálásához negatív (normál-normál DNS) és pozitív kontrollt (MPE-600 emlőtumor sejtvonal) használtunk.

A CGH hibridizáció értékelésére Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt számítógép-vezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert alkalmaztunk. A fluoreszcens képek rögzítése (mintánként 8-10 metafázis) monokróm CCD kamerával történt. Automatikus háttérkorrekciót követően a DAPI-sávozás alapján megszerkesztettük a kromoszómák kariogramját. A kromoszómális eltérések meghatározása a zöld és vörös fluoreszcencia intenzitások aránya alapján történt. DNS többletnek azokat az eltéréseket tekintettük, melyeknél a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitásarány  $>1,15$ ; DNS vesztésnek pedig azokat, melyeknél ez az arány  $<0,85$ . Az ún. diagnosztikai határértékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg.

## **Array-CGH**

Az M35/01 sejtvonal array-CGH vizsgálatát a teljes humán genomot lefedő 2460 BAC klónt tartalmazó krómllemezen végeztük a. A többi array-CGH kísérlethez 12300 cDNS elemet tartalmazó hagyományos chipet használtunk. A BAC- és a cDNS-alapú array kísérletek kivitelezése megegyezik, röviden: 1  $\mu$ g

teszt és referencia genomiális DNS-t random-priming módszerrel Cy3 dUTP-vel vagy Cy5-dUTP-vel megjelöltünk, a be nem épült nukleotidokat eltávolítottuk. A jelölt teszt és referencia DNS-eket Cot-1 DNS jelenlétében etanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t hibridizációs pufferben 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, majd mosóoldat sorozattal 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 Log<sub>2</sub> értékeket tekintettük kromoszómális többletnek, illetve hiánynak.

A cDNS array-CGH lemezeken a targetek fluoreszcencia intenzitását konfokális lézer szkennelvel rögzítettük és DEARRAY szoftver segítségével elemeztük. Az 1,2-nél nagyobb értékeket amplifikációnak, míg a 0,8-nél kisebb értékeket delécióknak tekintettük.

## **5. 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.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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

A *c-myc* onkogénre vonatkozó vizsgálataink fő célja a gén kópiaszám eloszlásának sejtszintű analízise volt különböző biológiai viselkedésű melanoma altípusokban 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 négy 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 ( $p=0,01$ ). Az egyik 9-es kromoszóma elvesztése a szuperficiális altípusnál, míg a 10-es kromoszóma egyik centromérájának deléciója a noduláris melanomáknál volt gyakoribb elváltozás. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a *c-myc* onkogén kópiaszám eltérésre a két melanoma altípus között. Megállapítottuk, hogy az agresszívebb biológiai tulajdonságú NM-ben a *c-myc* onkogén kópiaszám emelkedése szignifikánsan gyakoribb volt, mint a jobb prognózisú SSM-ben. A noduláris melanomák 61%-ában, míg a felszínen terjedő melanomáknak 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.

A jelen vizsgálatban tanulmányozott melanoma metasztázisok mindössze 21%-ában (14 tumorból 4) sikerült kimutatni alacsony vagy mérsékelt fokú *c-myc* amplifikációt. A primer melanomák és metasztázisaik között fennálló genetikai divergencia oka lehet az a nagyfokú kromoszómális heterogenitás, ami a primer melanomák már viszonylag korai stádiumára is jellemző. 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 más daganatoknál is beszámoltak. 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. Az extra *c-myc* kópia kialakulásának hátterében különböző molekuláris mechanizmusok állhatnak: i.) származhat a gént hordozó egész kromoszóma megtöbbszöröződéséből; ii.) eredménye lehet a 8-as kromoszóma hibás szétválásának; iii.) létrejöhet izokromoszóma kialakulása révén; és iv.) kialakulhat intra- és extra-kromoszómális amplifikációt követően. A *c-myc* gén megoszlása szinte valamennyi mintában heterogén volt, ami azt sugallja, hogy a daganatsejtek eltérő növekedési potenciállal rendelkeztek.

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* génterhelés 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. Az emelkedett *c-myc*/C8 kópiaszámmal jellemezhető daganatok arányában 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.

Eredményeink arra utalnak, hogy a felszínen terjedő és a noduláris melanomák 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.

### **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.

Kromoszómális CGH technikával 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. Természetesen nem zárható ki az sem, hogy a csak sejtvonalban észlelt eltérések az *in vitro* tenyésztés eredményeként jöttek létre.

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. 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 lokusz proximális régióját érintő töréspontot azonosítani. Az ezen a kromoszómális szakaszon elhelyezkedő *ciklin-D3* (CCND3) fehérjét kódoló gén expressziójának mértéke a legújabb megfigyelések szerint fontos szerepet játszik különböző daganatok kialakulásában, és egyes adatok arra utalnak, hogy fontos faktor lehet a felszínen terjedő melanomák klinikai viselkedésének megjósolásában.

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. Array-CGH vizsgálataink szerint jelentős számú amplifikálódott DNS szekvencia található a 7-es kromoszómán, leggyakrabban a 7q31-q36 közötti DNS szakaszon. Az itt lokalizálódó *braf* onkogén mutációja, ami gyakran a gén kismértékű amplifikációját jelenti, irodalmi adatok szerint a melanomák kétharmadában kimutatható. SKY-FISH-sel a 7-es és 17-es kromoszómák között transzlokációt figyeltünk meg.

A melanomák progressziójában 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. A sejtvonalban a kromoszómális CGH adatok szerint a 9-es kromoszóma jelentős része deléciót mutatott, ugyanakkor az array-CGH alapján a deléció a 9q szakaszra nagyobb mértékben terjedt ki. FISH-sel 9p21 lókuszs-specifikus szondával 2 szignált találtunk, ami a centoméra számhoz képest deléciót jelent.

Az eredeti tumorban és a sejtvonalban egyaránt a legnagyobb mértékű amplifikációt a 15-ös kromoszómán találtuk mind kromoszómális, mind array-CGH-el. Ez utóbbi adatok alapján figyeltünk fel a 15q15 szekvencia amplifikációjára. Ezen a lókuszon elhelyezkedő gének közül részletesen elemezték a *trombospodin-1 (tsp1)* gént, melynek terméke az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódik és számos biológiai folyamat szabályozásában játszik szerepet. A melanomákban változatos expressziót mutató *tsp1* fokozott strómális expressziója rossz prognózist jelent.

A 20-as kromoszómán CGH-el DNS többletet detektáltunk, amit a SKY-FISH eredmények is megerősítettek. Extra 20-as kromoszóma melanoma sejtvonalakban és natív tumorok genomjában nem ritka jelenség. A 20-as kromoszómán kódolt gének közül a normál fiziológiás folyamatokban az extracelluláris mátrix lebontásában szerepet játszó mátrix metalloproteináz protein (MMP) családhoz tartozó gén szerepe vetődik fel (MMP-9, 20q11-q13). Előrehaladott stádiumú melanoma sejtvonalakban kimutatták az MMP-9

expresszióját, míg korai stádiumú daganatokból létrehozott sejtvonalaknál ez nem volt lehetséges.

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.

### **Primer melanomák és melanoma metasztázisok cDNS alapú array-CGH vizsgálata**

A cDNS-fragmenteket tartalmazó chipek előnye, hogy az érett mRNS-ként megjelenő DNS szekvenciák eltéréseit jelenítik meg. Bár a cDNS-chipen alapuló CGH-módszer a kis, 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. A jelentős mennyiségű információt tartalmazó adatbázisok segítségével a kísérletekben azonosított gének kromoszomális elhelyezkedése könnyen meghatározható.

cDNS alapú array-CGH módszerrel eddig 9 daganat (4 betegből a primer és metasztatikus tumor ugyanabból a betegből származott) hibridizációját és analizisét 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 genetikai eltérések olyan mértékű halmozódása alakult ki, melyhez már kisszámú új eltérés létrejötte is elegendő volt, hogy a metasztázis makroszkóposan is megfigyelhetővé váljon. Abban az esetben, ha referens DNS-ként normál DNS-t használtunk, a primer tumorban több mint hatszáz cDNS elem amplifikációját, és hasonló számú elem delécióját figyeltük 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 megfigyeléseinket, melyek szerint a genetikai aberrációk fokozatos akkumulációja összefügg, illetve arányos a melanoma agresszivitásával.

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

## ÖSSZEFOGLALÁS

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 centromérájának 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* amplifikáció csak a rosszabb prognózisú noduláris melanomákban volt kimutatható.
4. A *c-myc* gén amplifikációja és a klinikopatológiai paraméterek között az alábbi összefüggéseket találtuk:
  - A törzsön, illetve a fej-nyaki régión elhelyezkedő daganatok közül szignifikánsan több noduláris melanománál mutattunk ki *c-myc* amplifikációt, mint a végtagokon elhelyezkedő lézióknál.
  - A noduláris melanomák között az extra *c-myc* kópiát tartalmazó kifekélyesedett tumorok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a felszínen terjedő daganatoknál.
  - A nyirokcsomó metasztázist képző noduláris melanomák között szignifikánsan több daganat mutatott *c-myc* gén kópiaszám emelkedést.

- Azoknál a betegeknél, akik a primer tumor eltávolítását követően 5 éven belül meghaltak, a *c-myc* gén kópiaszám emelkedés gyakoribb volt a noduláris melanomákban ( $p = 0,02$ ).

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 kariótípusa komplex, a kromoszómák számbeli eltérései mellett számos strukturális eltérés is jelen volt.
- 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 és cDNS array alapú komparatív genom hibridizációs módszerekkel a kromoszómális CGH-hez képest pontosabban meghatározható az amplifikált és deletált szekvenciák lokalizációja.

- Az array-CGH alapján a sejtvonalban a legnagyobb mértékű amplifikációt a 7q (7q22-q31), 15q (15q21-q25), 20q (20q13) kromoszómakarokon, a legnagyobb mértékű deléciót 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.

## KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### 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., Rákosy 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.

IF: 2,095

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

### Egyéb *in extenso* közlemények és indézhető absztraktok

Toida M., Balázs M., **Treszl A.**, Rákosy 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. 2002. Suppl. 1.

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

Barok M., Szincsák N., **Treszl A.**, Balázs, M. Vereb Gy. Szöllősi J.: Analysis of a Herceptin<sup>®</sup> 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.

### **Az értekezés témájához kapcsolódó előadások és poszterek**

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., Szincsák 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. 3<sup>rd</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> resistant breast cancer xenograft. XVIII Conference of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Ausztria