

**A 48750 OTKA pályázat eredményeit összefoglaló szakmai
záróbeszámoló**

A pályázat címe

**Genomiális eltérések és génexpresszió közötti
kapcsolat vizsgálata, melanomák metasztázisképzésére
jellemző genetikai markerek kutatása**

Title of the project

**Association between genomic alterations and gene
expression, search for genetic markers in association
with melanoma metastasis formation**

A pályázat megvalósításában meghatározó szerepet játszott

DE OEC Megeglőző Orvostani Intézet Biomarker Analízis Tanszék
Dr. Rákosy Zsuzsa, Esedi Szilvia, Lázár Viktória, Vízkeleti Laura,
Dr. Ádány Róza

DE OEC Bőrgyógyászati Klinika
Dr. bágány Ágnes és Dr. Emri Gabriella

2009. november 30.

A kutatás eredményei (szakmai beszámoló)**A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program ismertetése**

OTKA pályázatunk célja volt

- azoknak a genetikai eltéréseknek a tanulmányozása, melyek primer melanomák agresszív metasztázisképző tulajdonságával hozhatók kapcsolatba,
- molekuláris szinten felderítsük azoknak a különbségeknek a felderítése, melyek a melanoma malignum egyes altípusai között állnak fenn és azok eltérő biológiai viselkedését eredményezik,
- a primer daganatok és metasztázisok megjelenését előrejelző molekuláris eltérések kimutatása,
- modellrendszerekben a perifériás vérben keringő daganat sejtek kimutatása (*haematogén disszemináció*).

Vizsgálatainkhoz a molekuláris genetika két *in situ* hibridizációs módszerét, az összehasonlító (komparatív) genomiális hibridizációt (CGH) és a fluoreszcencia *in situ* hibridizációt (FISH) mellett array CGH, génexpressziós mikroarray és immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. Eredményeink statisztikai elemzésével vizsgáltuk, hogy a különböző stádiumú és típusú szövetekre jellemző genetikai eltérések és a génexpresszió mintázata milyen összefüggésben áll a humán melanomák klinikopathológiai paramétereivel.

Az elvégzett vizsgálataink irányvonalait, melyek összhangban vannak a pályázatban leírt kutatási tervvel röviden az alábbiakban foglaljuk össze:

- I. Primer melanomák gén kópiaszám eltéréseinek analízise DNS mikroarray segítségével***
- II. Primer és metasztatikus melanomák genetikai eltéréseinek összehasonlítása***
- III. array CGH-el a primer melanomákban a leggyakrabban előforduló kromoszómális eltérések tanulmányozása egyedi sejtek szintjén***
- IV. Primer és metasztatikus melanomák genetikai eltéréseinek összehasonlítása***
- V. Génkópiaszám eltérések és génexpresszió vizsgálata különböző biológiai viselkedésű primer melanomákban***

Az alkalmazott fontosabb módszerek rövid ismertetése:

A kutatási téma megvalósítása során a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) és a komparatív genomiális hibridizáció (kromoszómális, a genom jelentős részét lefedő 2464 BAC klónt tartalmazó (HumArray3.1 chip) és oligo alapú (60 mer tilling high resolution 72 000 whole genom array Nimblegene) array CGH), génexpressziós (47 400 transzkriptum analízisére alkalmas humán Genechip U133 2.0 plus array, q-PCR alapú Taqman Low Density Array), kvantitatív PCR és immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. A vizsgálatok kivitelezése során az irodalomban megjelent protokollokat módosítottuk a jobb kísérleti hatásfok és a FISH eredmények objektívebb értékelhetősége céljából (1-7). A keringő daganatsejtek kimutatására új

eljárást dolgoztunk, (8). A DNS kópiaszám vizsgálatokhoz új módszert írtunk le, mellyel kis mennyiségű DNS mintákban is lehetővé válik a génkópiaszám meghatározása, abban az esetben is, ha nem áll rendelkezésre génspecifikus próba (9). Immunhisztokémiai eljárásokat az alkalmazott antitesteknek megfelelően módosítottuk (4). Azokból a szövetekből, melyekben a normál sejtek kontaminációja 40%-nál nagyobb volt a tumor sejteket mikrodisszekcióval nyertük ki a CGH és génextpressziós kísérletekhez.

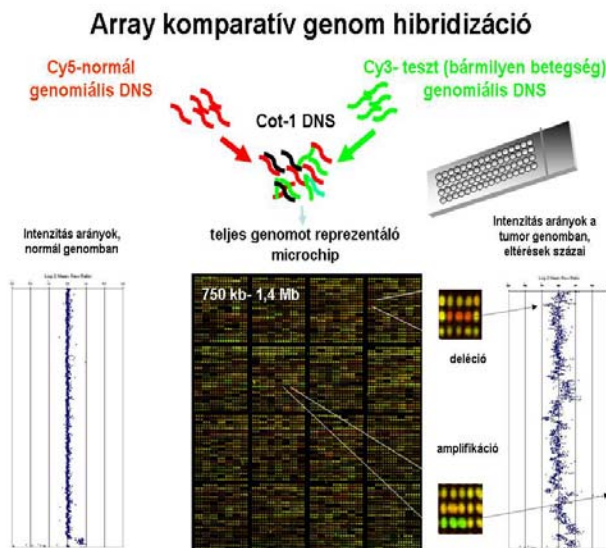
Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

Az eltelt két évtized alatt az *in situ* hibridizáció technikák közül a FISH technika a citogenetikai módszerek egyik alapvető módszere lett sok szempontból átalakult és tökéletesedett, mind a kísérleti protokollok, mind az alkalmazott kutatás, mind a rutindiagnosztika szintjén. Vizsgálataink során kromoszómák számbeli eltéréseinek kimutatására centroméra specifikus és kromoszómafestő DNS próbákat (*szondákat*), míg a strukturális eltérések detektálására a kromoszómát festő, a gén specifikus, valamint a töréspont specifikus DNS próbákat alkalmaztunk.

A centroméra- és gén specifikus DNS próbákat részben magunk preparáltuk a humán inserteket tartalmazó bakterium klónokból, részben a VYSIS cégtől szereztük be. A kromoszóma specifikus próbákat nick translációval jeleztük direkt (FITC, SpectrumGreen vagy SpectrumRed-dUTP) jelzett nukleotidokkal. A centroméra specifikus próbák jellegzetessége, hogy a kromoszómák heterokromatinjához (sokszorososan, tandem-ismétlődő szakaszokhoz) hibridizálódva nagyméretű fluoreszcens szignált szolgáltatnak, így mikroszkóppal az eltérések könnyen megfigyelhetők, a lókuszt (vagy gén) specifikus próbák a komplementer szekvenciák szegmenseit jelenítik meg (1-14).

Összehasonlító genom hibridizáció (comparative genomic hybridization; CGH)

A CGH a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció elvén alapuló molekuláris genetikai módszer. CGH-el a tumor sejtek genomjában előforduló kromoszómális eltérésekről (relatív DNS-amplifikációkról és -deleciókról) nyerünk információt.



1. ábra array CGH sematikus ábrázolása. CGH profilok a normál-normál genomok hibridizációját (A) és a normál – melanoma genomok hibridizációját követően

Ezzel a módszerrel a tumor genomban nemcsak ismert génamplifikációk és gendeleciók detektálhatók, hanem ismeretlen genetikai eltérések (DNS többletek és hiányok) is kimutathatók, valamint a CGH technikával lehetőség van a tumor sejtekben talált genetikai eltérések kromoszómális szintű feltérképezésére is normál kromoszóma preparátumokon. A CGH felbontásának javítását és technika hátrányainak kiküszöbölését célozta meg a 90-es évek végén kidolgozott CGH array módszer. A tárgylemezre normál

metafazisos kromoszómák helyett pontosan ismert lokalizációjú klónozott DNS szekvenciák ezreit, vagy különböző méretű, oligokat rögzítenek (1. ábra).

Microarray alapú génexpressziós analízis

Kísérleteinkhez az Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-t használtuk, mely a jelenleg forgalomban lévő génexpressziós array-ek közül az egyik legnagyobb felbontású, összesen 47400 transzkriptum analizisére alkalmas egyetlen hibridizáció során. Harminchét primer tumor és 6 melanoma metasztázis génexpressziós mintázatát elemeztük. Az RNS preparálást friss és fagyaszott szövetekből RNeasy Mini kit-el (Qiagen, GmbH, Németország) végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján. A p16 génre specifikus QRT-PCR-al valamennyi mintánál vizsgáltuk, hogy a hibridizálódott minták mentesek-e az RNS A. rtranszkripcióját gátló biológiai inhibitoroktól. Az RNS min B. reverz transzkripcióját, fluoreszcens jelölését és array hibridizációját a heidelbergi European Molecular Laboratory Genomics Core Facility Genechip laboratóriumában végezték el. A hibridizáció során nyert fluoreszcencia intenzitási adatokat az Agilent Genespring 7.3.1 software segítségével analizáltuk.

Microarray adatok statisztikai elemzése

A génexpressziós eredmények elemzésének első lépése a nyers fluoreszcencia intenzitás adatok többszörös normalizálása volt. A chipen lévő 47 400 transzkript közül csak azokat vettük figyelembe, amelyekhez a tumor minták megfelelően hibridizáltak. A program az egyes array elemekben, „spot”-okban található megfelelő („match”) és nem megfelelő („mismatch”) próbapárok intenzitási értékéből a háttér érték korrekciójával számol egy valószínűségi értéket, amely alapján értékeli a hibridizáció sikerességét az adott spot-hoz. Az analízis során csak azokat a géneket vettük figyelembe, amelyek a 43 mintából 22-ben jelen („present”) illetve megfelelő („marginal”) indexel szerepeltek. A további statisztikai analíziseket az ily módon szűrt, 25 886 transzkriptet tartalmazó génlistán végeztük el. A 37 primer melanoma globális analíziséhez egy ún. nem szabályozott („unsupervised”) klaszter elemzést, a „Principal Component Analysis (PCA)”-t használtuk, mely lehetőséget ad a tumorok csoportosítására génexpressziós mintázatuk alapján.

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

Jelátviteli útvonal analízis

Az analízist a daganatok felszínének kifeléyesedésével összefüggő szignifikáns eltérést mutató gének csoportján (1095) végeztük el. A génlistákban szereplő gének funkcionális szerepét az „Ingenuity Pathways Analysis software (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) és Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>)” programokkal elemeztük. Ezekkel a programmal lehetővé válik a gének különböző jelátviteli útvonalakban való részvételének és kölcsönhatásának azonosítása.

Taqman Low Density Array (TLDA)

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

DNS kópiaszám vizsgálata kvantitatív real-time PCR-el 11q13-as génklaszterben lokalizálódó gének eltéréseinek analízisére

A rendelkezésre álló szekvenciák alapján a Primer Express 2.0.0 software (Applied Biosystems, Foster City, USA) és Primer3 (Whitehead Institute, Cambridge, USA) program segítségével megterveztük a lehetőségek szerinti legideálisabb primereket a kísérletek elvégzéséhez. A másodlagos struktúrák – például „hajtű” formációk – elkerülésének érdekében, melyek csökkentik a PCR reakció specificitását, hatékonyságát igénybe vettük a hálózatról elérhető MFOLD version 3.2 szoftvert (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>). A PCR reakció optimalizálása során, empirikus úton meghatároztuk a primerhibridizációs lépés hőmérsékletének, illetve a primer mennyiségének optimális paramétereit.

A vizsgálatok során alkalmazott daganat szövetminták

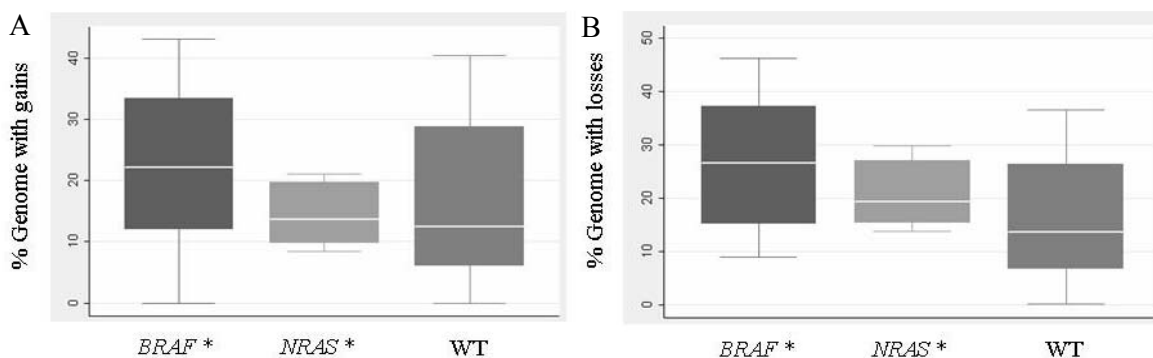
A humán tumor szövetek a DOTE Bőrgyógyászati Klinikájával történő kollaboráció révén kerülnek feldolgozásra szövettani analízist követően, az intézet molekuláris morfológiai laboratóriumában, a DE OEC Etikai Bizottságának engedélye alapján és irányelvei szerint. A betegek klinikai adatait a közlemények részletesen ismertetik.

Malignus melanomából eddig közel 100 primer daganatot elemeztünk az előzőekben ismertetett módszerekkel. A vizsgálati anyagokból a CGH és génexpressziós analízisre úgy kerültek kimetszésre, hogy a normál sejt kontamináció a mintákban minél kisebb legyen. A műtét után, a szövettani diagnózist követően, amennyiben lehetőség volt rá a friss szövetből azonnal tumorlenyomat preparátumot készítettünk, a tárgylemezeket fixálás után FISH analízisig -20 °C -on tároltuk (tárgylemezre fixált sejtek). Minden szövet mintából a későbbi interfázisos kromoszóma analízishez legalább 30 tárgylemezt készítettünk. A szövetekből DNS-t preparáltunk. A DNS-t – 20 °C-on tároltuk későbbi analízisekhez. Ha a tumor szövetből nem tudtuk frissen kiperarálni a DNS, RNS és lenyomat preparátum mintákat, a szöveteket TissueTek-ben lefagyasztottuk (tárolás – 80 °C-on). Az így tárolt minták egyaránt alkalmasak voltak később DNS és RNS preparálásra, valamint tumorszövet lenyomat preparátumok készítésére is. A tumorlenyomat preparátumok készítésénél az irodalomban leírt módszereket módosítottuk, az általunk kidolgozott módszerrel a sejtek adherenciája megnőtt és az interfázisos FISH közel 90%-ban sikeres lett.

Eredmények

Primer melanomák gén kópiaszám eltéréseinek analízise DNS mikroarray-ken

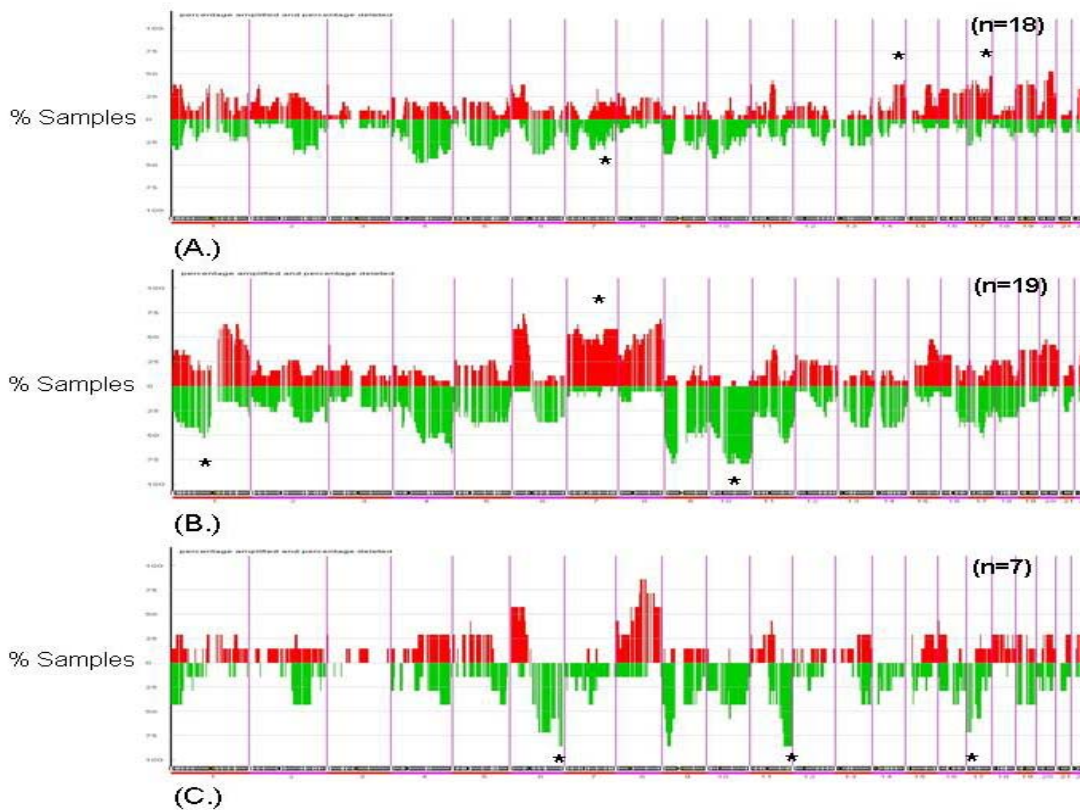
Array CGH vizsgálataink a teljes humán genom jelentős részét lefedő 2464 BAC klónt tartalmazó HumArray3.1 chipen történtek. Az array CGH eredmények validálására FISH és Q-PCR módszereket alkalmaztunk. Az adatok statisztikai elemzéséhez CGHanalyzer, CGHexplorer 3.2 és az SPSS programokat használtunk. Figyelembe véve, hogy melanomákban a BRAF és NRAS onkogének mutációi gyakran előforduló mutációk és prognosztikai jelentőségüknek tisztázása még jelenleg is folyamatban van, valamennyi primer melanoma mintánál elvégeztük a két onkogén jellegzetes mutációinak elemzését és így lehetőségünk volt az array CGH adatoknak és a mutációs analízisek eredményeinek együttesen elemezésére. BRAF-600 mutációt a primer melanomák 58%-an találtunk, míg az NRAS mutáció sokkal kisebb frekvenciával fordult elő (16%). A két mutáció együttesen soha nem fordult elő. A 4.-es ábra szemlélteti azt a megfigyelésünket, melynek értelmében a BRAF mutációt hordozók daganatokban szignifikánsan magasabb volt a genom eltérések száma hasonlítva a mutációt nem tartalmazó melanomákhoz (13).



4. ábra Primer melanomák genom eltérései array CGH analízissel. A.) DNS többletek (gains) és B.) DNS hiányok (losses) BRAF mutációt (*BRAF**), *NRAS* mutációt (*NRAS**) és az előző mutációkat nem tartalmazó (*WT*) tumorokban. (Mann-Whitney test; $p=0.0433$ és $p=0.0122$, a DNS többletekre és hiányokra külön-külön).

Elemeztük az eltérések frekvencia eloszlását a „mutációs csoportokon” belül valamennyi kromoszómára vonatkoztatva. „Fisher exact” teszt alkalmazásával megállapítottuk, hogy az egyedi BAC klónok közül a BRAF mutációs csoportba tartozó daganatokban a 7p22.3-p13, 7q21.3 és 7q31.2-7q36.3 lokuszok többlete, és a 10q21.3, 10q26.13 és 10q26.3. lokuszok hiánya (deléciója) szignifikánsan gyakrabban fordult elő, valamint ebben a csoportban volt a legnagyobb az eltérések száma. A leggyakoribb DNS többletet az 1q22-1q41, 6p23-6p12.3, 8p12-8q12.1, 8q22.2-8q24.23 és 20p12.3-20p12.1 lokalizációjú BAC klónokon, míg a leggyakoribb DNS vesztést a 4q34.3-4q35.1, 9p21.3-9p13.2, 11q14.2-11q23.3, 14q11.2-14q32.13 és 17q21.31-17q22 szekvenciákon figyeltük meg. Az *NRAS* mutációt hordozó mintákban a 6q25.2-6q26, 11q25 és a 17p13.3 lokuszok alterációi voltak a leggyakoribb eltérések. A két onkogén mutációját nem tartalmazó WT (wild type) mintákban megfigyelt DNS többletek a 14q24.1-14.q32.3 és 17q11.2-17q12 lokuszokon, és DNS vesztések a 7p21.1-7p14.3

és 7q31.31-7q31.33 DNS szakaszokon ezekben a daganatokban gyakrabban fordultak elő, mint a másik két, mutációs csoportban (5. ábra).

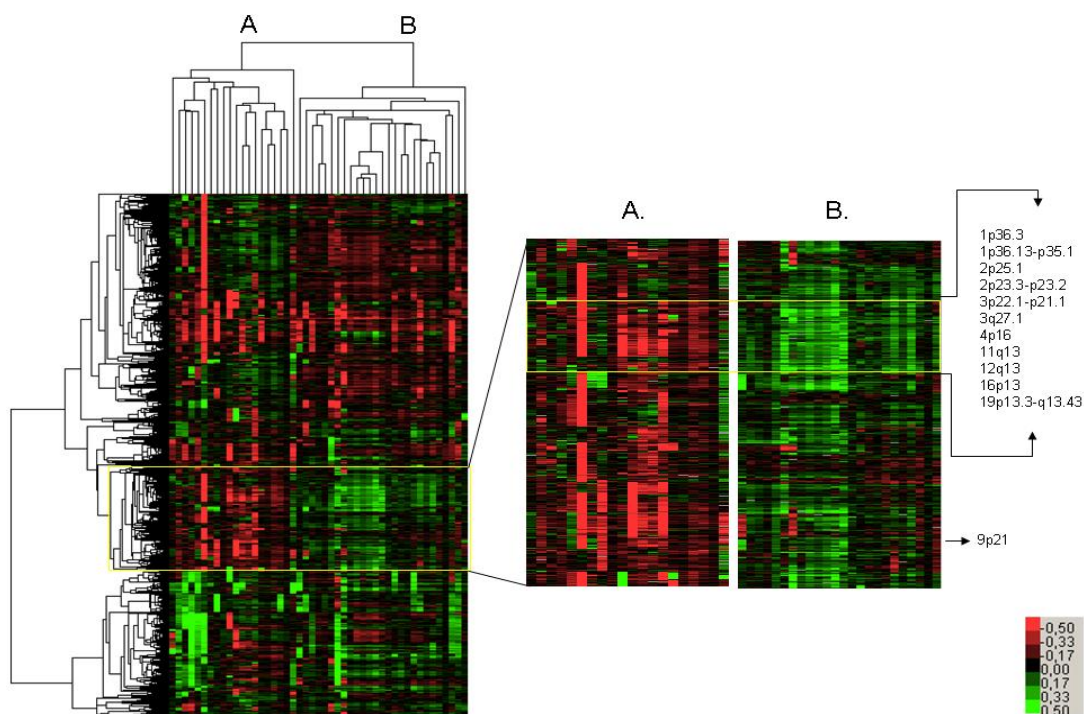


5. ábra Primer melanomák genom eltréseinek frekvencia diagramja. A.) BRAF és NRAS mutációt nem tartalmazó csoport, B.) BRAF mutációt hordozó daganatok, C.) NRAS mutációt hordozó tumorok. *-al a szignifikáns eltérést mutató kromoszóma szakaszokat jelöltük.

Array CGH eredményeinket a betegek klinikai és a daganatok patológiai adataihoz hasonlítottuk. A kliniko-patológiai adatok közül kiválasztottunk azokat a paramétereket, melyek egyértelműen rossz prognózist jeleznek és így meghatározzák a magas rizikójú csoportot. Ezek a >2.00 mm Breslow tumor tumorvastagság, IV.-V. Clark szint, kifehélyesedett tumor felszín, nuduláris melanoma altípus, metasztázis a primer tumor eltávolítását/észlelést követően 3 éven belül vagy a beteg 3 éven belül elhalálozott. A fentiek közül a legalább 3 paramétert tartalmazó faganatokban szgnifikánsan gyakrabban figyeltünk meg a 2p14, 6p24.3, 6p22.2-6p21.1, 6p22.3, 7p12.2, 8q24.22 and 20p12 lókuszokon DNS többletet jelentősen nagyobb frekvenviával az 1p13, 1p21, 1p31.3, 2q37, 4q21.22-q21-23, 5q33.1, 9p13.3-13.2, 9p21.2-p21.1 és 11q22-q25 szakaszokon DNS vesztéseket. Ezek a régiók számos, a melanoma tumorigenezisben meghatározó szerepet játszó gént hordoz, melyek *CDKN1A* (6p21.31), *CYP24A1* (20q13.1), *EGFR* (7p11.2) gének amplifikációit, vagy a *CDKN2A* (9p21.3) és *OPCML* (11q25) gének delécióit jelentik. Nagyon fontos megfigyelés, hogy ezek az eltrések sokkal gyakoribbak a BRAF vagy NRAS mutációt hordozó mintákban.

Az array CGH eredmények klaszter analízise (unsupervised hierarchical clustering) két meghatározó alcsoportjában legjobban a Clark szint IV-V (A.) és I.-III. (B.) csoportja különült

el (6. ábra). A jobb prognózissal jellemezhető csoportot a DNS többletek, génamplifikációk (6A ábra), míg a rosszabb prognózisú csoportot a deléciók jellemezték (6B. ábra).



6. ábra Primer melanomák genom eltéréseinek klaszter analízise. A.) a klaszterbe a Clark IV-V szinttel, B.) a Clark I-III szinttel jellemzett tumorok sorolódtak ($p=0.032$).

Mivel a melanomák kilakulásában meghatározó etiológiai faktor az UV sugárzás, a primer melanomák genom eltéréseit analizáltuk abból a szempontból is, hogy találunk-e olyan szignifikáns eltéréseket, melyek kapcsolatba hozhatók a krónikus napsugár expozícióval. Megfigyeltük, hogy a krónikus napugárással jellemzhető daganatoknál a fókuszált génamplifikációk sokkal gyakoribbak a 11q13.4, 20q13.2 és 13q12 lokuszokon, míg a deléciók elsősorban a 3p, 5q és 8p kromoszóma karokat érintik.

Array CGH eredményeinket számos gén és lokusz specifikus próbával egyedi sejtek szintjén is igazoltuk, valamint jó korrelációt találtunk PCR-e történt validáció során is.

Összefoglalva: eredményeink korrelálnak az eddig leközölt adatokkal, de számos új megfigyelést is tartalmaznak. Fenti eredményeink jelenleg vannak közlésre elküldve, a zárójelentésben a legfontosabb megfigyeléseinket emeltük ki.

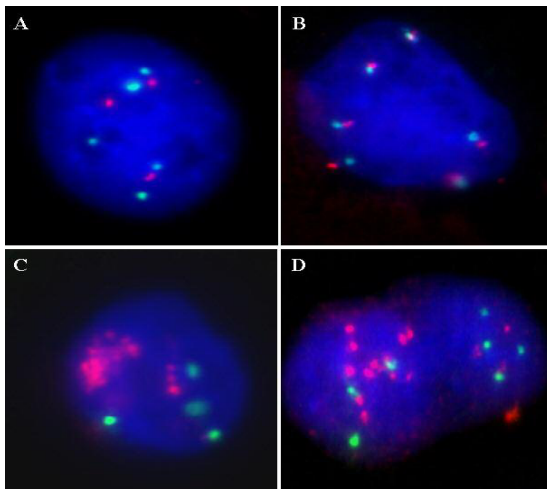
Eltérő biológiai viselkedésű primer melanomák FISH analízise kromoszóma centoméra, valamint EGFR és 9p21 lokusz specifikus DNS próbákkal

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

Kísérleteink ebben a szakaszában tanulmányoztuk az EGFR gén, valamint a 7-es kromoszóma számbeli eltéréseit, azok kapcsolatát a sporadikus melanomák klinikai és hisztopatológiai paramétereivel (4). Kísérleteinkhez friss és fagyasztott tumorokból készített

lenyomat preparátumokat használtunk. Nyolcvanegy primer melanoma minta interfázisos FISH analízisét végeztük el (44 férfi és 37 nő), 61 tumornál a követési idő több mint 5 év volt. FISH kísérleteinkben fluoreszcens dUTP-vel módosított 7-es centroméra- és EGFR génspecifikus DNS próbákat párhuzamosan hibridizáltuk. Az EGFR gén eltéréseit az alábbiak szerint csoportosítottuk: i.) *EGFR deléció*: ha az EGFR kópiaszáma kevesebb a 7-es centroméra kópiaszámánál a sejtek több mint 10%-ában, ii.) *látszólagos amplifikáció*: 7-es centroméra és az EGFR gén kópiaszáma megegyezett, de több mint kettő (látszólagos amplifikáció, ahol a kromoszóma sokszorozódása vonja maga után a lokusz amplifikációját), iii.) *kismértékű amplifikáció*: a gén kópiaszáma maximum ötszöröse volt a centroméra szignálszámának, de nem haladta meg a sejtenkénti tíz kópiát, iv.) *nagymértékű amplifikáció*: az EGFR szignálszáma több mint ötszöröse a centroméra szignál számának és meghaladta a sejtenkénti tíz kópiát a sejtek több mint 10%-ában. Az EGFR génindexet az alábbiak alapján határoztuk meg: összes fluoreszcens szignál száma/a FISH-el értékelt sejtmagok száma. A tumorok ploiditásának meghatározásához a 7-es kromoszómán kívül 1-es, 3-as, 6-os, 8-as, 9-es, és 10-es kromoszómák számbeli eltérését is vizsgáltuk centroméra specifikus próbákkal. Minden tumornál legalább három különböző kromoszómánál detektáltunk számbeli eltérést, mely magába foglalta a 9-es és 10-es kromoszómák delécióját, valamint a 6-os és 8-as poliszómiáját. A 7-es kromoszóma aneuzómiáját a léziók 70%-ában mutattuk ki.

Az EGFR gén számbeli eltérését 64 (79%) lézióban figyeltük meg. Az EGFR gén index 1,0 és 8,9 között változott. A primer melanomák többségére a gén kismértékű amplifikációja volt jellemző. Tizenhárom melanomában detektáltunk nagymértékű amplifikációt, de ez az elváltozás csak hat tumornál érintette a sejtek több mint 10%-át (15. táblázat). Az EGFR többlete a 7-es kromoszóma poliszómiájával társult ($p < 0,0001$). A gén amplifikációja mellett három mintában a gén delécióját is kimutattuk, mely a 7-es kromoszóma monoszómiájával asszociálódott. Az EGFR gén FISH-el kimutatott jellegzetes kópiaszám eltéréseit a 7. ábrán foglaltuk össze.



7. ábra Primer melanoma sejtek interfázisos FISH analízise EGFR gén (piros szignál) és 7-es kromoszóma specifikus (zöld szignál) próbával, a sejtmagok DAPI-val jelöltek (kék)

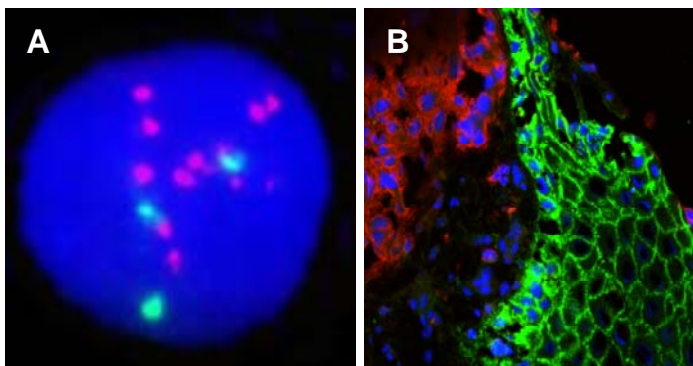
A.) *EGFR deléció*, B.) *látszólagos amplifikáció*, C.) *klaszteres amplifikáció*, D.) *„scattered” gén amplifikáció*

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

Tizenhat FISH-el analizált melanoma mintánál az EGFR génkópiaszám eltéréseket génextpressziós adatokkal is össze tudtuk hasonlítani. Az EGFR mRNS mennyiségi meghatározásához az Affymetrix array-en lévő 201984_s_at próba \log_2 transzformált expressziós értékeit használtuk. Az array-en kapott génextpressziós eredményeket qPCR-al erősítettük meg. Hét lézióban nem találtunk EGFR kópiaszám eltérést, ezen minták expressziós

értékeinek átlagát választottuk viszonyítási értéknek. A további minták közül 5-öt kismértékű amplifikáció, 3-at látszólagos amplifikáció, és 1-et nagymértékű amplifikáció jellemzett. Ezen mintákból öt lézióban több mint kétszeres mRNS szintet mutattunk ki a 7 nem amplifikált mintához viszonyítva. Az egyik látszólagos amplifikációt hordozó mintában (7-es minta) több mint ötszörös mRNS szintet figyeltünk meg, ugyanakkor a léziót a receptor fehérje gyenge kifejeződése jellemezte. A 9-es mintában kismértékű amplifikációt és közepes fehérje expressziót detektáltunk.

Az immunhisztológiai vizsgálatokra a FISH eredmények alapján látszólagos-, kismértékű és nagymértékű amplifikációt hordozó, valamint normál kópiaszámú és EGFR delécióval jellemezhető mintákat választottunk ki. Az EGFR fehérje kimutatására a fehérje extracelluláris részére specifikus direkt jelzett antitestet alkalmaztunk. Annak érdekében, hogy a mintákban a melanoma sejteket elkülönítsük a bőrben található egyéb sejtektől CD63 melanoma antigénre specifikus monoklonális antitestet használtunk. A kontroll mintaként használt normál bőrben az epidermisz réteg keratinocitáinak erőteljes EGFR expresszióját, ugyanakkor a CD63 festődés teljes hiányát mutattuk ki. Ezzel szemben a tumor mintákban a melanoma sejteket erőteljes membrán és citoplazmatikus CD63 kötődés jellemezte. A léziókban az EGFR fehérje gyenge vagy expressziójának teljes hiánya volt megfigyelhető függetlenül a mintákban detektált EGFR kópiaszámtól és az mRNS expressziójának mértékétől. Kismértékű amplifikációt hordozó melanomákban gyenge illetve közepes mértékű fehérje expressziót tapasztaltunk. A számbeli eltérést nem tartalmazó melanomákban EGFR fehérjét nem tudtunk kimutatni. Nagymértékű amplifikáció nem társult fehérje expresszióval (8-es ábra).



8. ábra EGFR amplifikáció és CD63 és EGFR expresszió ugyanaból a betegből származó interfázisos sejten (A) és szöveti metszeten (B). A.) Az EGFR gén nagymértékű amplifikációja (piros fl.), 7-es kromoszóma (zöld fl.), sejtmag DAPI-val jelölt (kék fl.) B.) az epidermisz sejtekben erőteljes EGFR expresszió (zöld), a melanoma sejteket CD63 pozitívítás (piros) és az EGFR fehérje kifejeződésének hiánya

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

Klinikopatológiai paraméterek és az EGFR gén kópiaszám eltérései közötti kapcsolat

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

Hisztológiai altípus: Az EGFR gén számbeli eltérései közel azonos mértékben fordultak

elő az SSM és NM tumorokban. A gén nagymértékű amplifikációját 5 noduláris tumornál mutattuk ki, ugyanakkor ez az elváltozás csak egy SSM léziót érintett. Az átlagos génkópiaszám szignifikánsan magasabb volt a rosszabb prognózisú NM melanomáknál (17. táblázat, $p = 0,023$).

Daganat vastagság: A daganat vastagság és az EGFR alteráció közötti összefüggést vizsgálva, az átlagos EGFR kópia szignifikánsan magasabb értékűnek adódott a 4,01 mm-nél vastagabb tumorokban a vékonyabb tumorokhoz képest ($p < 0,0001$, 1. táblázat). A gén látszólagos és kismértékű amplifikációját az összes vastagsági kategóriába tartozó daganatnál kimutattuk, de az EGFR nagymértékű amplifikációja csak a >4,01 mm-nél vastagabb melanomákra volt jellemző ($p = 0,05$).

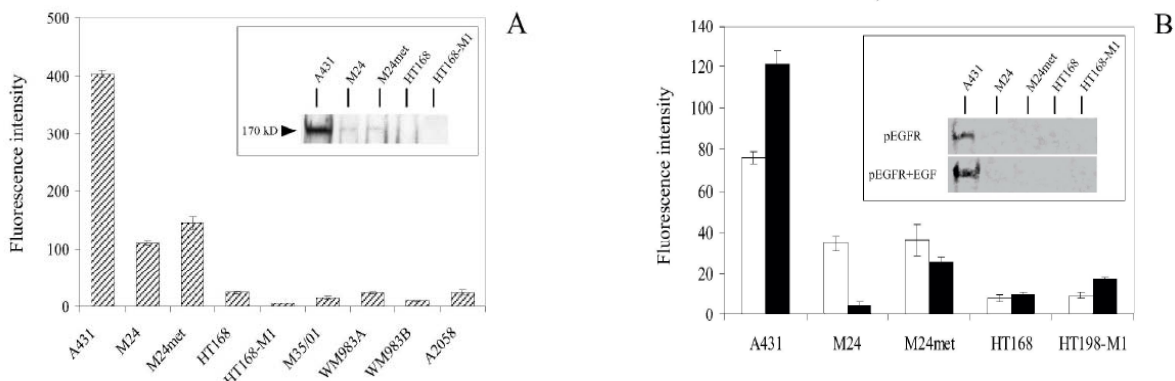
Metasztázis képzés és túlélés: Az EGFR kópiaszám index az 5 éven belül metastázist képző daganatokban szignifikánsan magasabbnak adódott a nem metastatizáló tumorokéhoz képest ($p = 0,038$). Nagymértékű amplifikációt csak az áttétet képző melanomákban mutattunk ki. Ugyanakkor a gén többlet mellett 4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

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

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

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

Egyedül az M24 és annak metastázis párjában (M24met) detektáltuk a receptor fehérje gyenge expresszióját (9A. ábra). Az analizált sejtvonalak közül, függetlenül a 7-es kromoszóma és az EGFR gén kópiaszámától, csak az M24 sejtvonalban tudtuk kimutatni az EGFR intracelluláris tirozinkináz részének foszforilációját, melynek mennyisége ligand kezelés hatására nem változott (9B. ábra). Ezzel ellentétben a nagymértékű EGFR amplifikációt hordozó A431 kontrol sejtvonalban kétszer magasabb volt a pEGFR-el szintje stimuláció előtt az M24 sejtvonalhoz képest, ez a mennyiség ligandkezelés hatására szignifikáns mértékben megnövekedett (9B. ábra).



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

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy eredményeink alapján, a korábbi irodalmi adatokkal egyezően, primer melanomákban a 7-es kromoszóma poliszómiája rossz prognózissal társul. Elsőként írtuk le az EGFR gén sejtszintű eltéréseit és klinikopatológiai paraméterek közötti kapcsolatot nagyszámú melanoma mintán. A primer léziók több mint 50 %-ában EGFR gén többletet találtunk. A génstátuszra jellemző extrakópia legtöbbször kismértékű fehérje expresszióval társult, a génamplifikáció, más daganatokkal ellentétben, nem eredményezte az EGFR fehérje fokozott mértékű kifejeződését. Eredményeink alapján az EGFR amplifikáció primer melanomák metasztázis képző hajlamára prognosztikai jelentőséggel bírhat. Primer melanomák EGFR eltéréseinek klinikai relevanciájához szükséges az mRNS- fehérje- és génkópiaszám eltérések szimultán analízise, különösen azokban a mintákban melyek EGFR extra kópiát tartalmaznak. Az EGFR extra kópiaszámmal összefüggő molekuláris eltérések további vizsgálatokat sürgetnek, melyek célja lehet, annak kiderítése, hogy azoknál a melanomás betegeknél, akik daganata EGFR kópiaszám eltérést hordoz, hasonlóan, mint ahogyan az bebizonyosodott más daganatoknál, hatásos lehet-e az anti EGFR immun illetve gefitinib terápia.

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

Kísérleteink célja a 9p21 régió kópiaszám eltéréseinek analízise interfázisos melanoma sejtekben fluoreszcencia *in situ* hibridizációval, valamint az eltérések és a daganatok klinikopatológiai tulajdonságai közötti kapcsolat vizsgálata. Nyolcvanegy primer melanomát analizáltunk 9p21 lokusz és 9-es centroméra specifikus próbákkal. A daganatokat klinikai és patológiai tulajdonságaik alapján csoportokra osztottuk. A 9p21-es lokusz és 9-es centroméra specifikus szignálokat valamennyi sejten együttesen értékeltük. Monoszómiásnak tekintettük azt a daganatot, amelyben a vizsgált sejtek több mint 20%-a egy jelet, poliszómiásnak, amelyben a vizsgált sejtek több mint 15%-a két 9-es centroméra szignált hordozott.

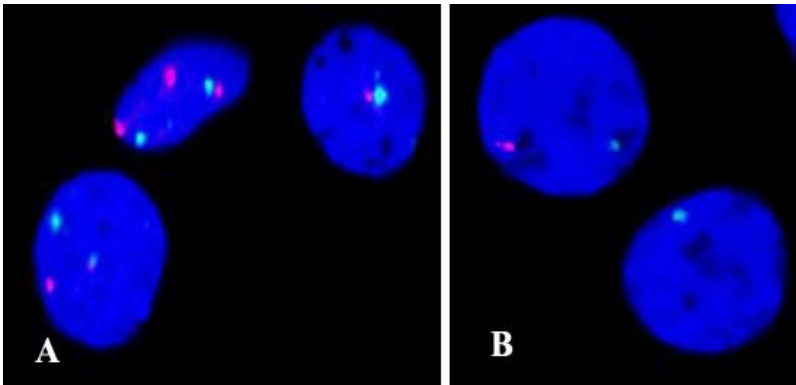
A 9-es kromoszóma delécióját a korai és a késői stádiumú melanomákban egyaránt nagy százalékban kimutattuk. A 9-es kromoszóma vesztését a felszínesen terjedő (SSM) minták 44%-ában, míg a noduláris altípusba (NM) tartozó tumorok 24%-ában detektáltuk. A kromoszóma poliszómiáját 25 lézióban az analizált sejtek több mint 20%-ában figyeltük meg, ez az elváltozás 16 tumor esetében a sejtek több mint 50%-át érintette. Ezekben a tumorokban a poliszómiás

sejtek mellett monoszómiás sejtpopuláció nem volt kimutatható. Egy lézióban több mint hat 9-es centroméra szignált találtunk a sejtek jelentős részében. A 9-es kromoszóma poliszómiája mindkét hisztológiai altípusban hasonló frekvenciával fordult elő (31%).

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

A 11. ábra szemlélteti a primer melanómákban FISH-el kimutatott jellegzetes 9p21-es eltéréseket. Az 11.A ábrán 3 különböző 9p21 számbeli eltérést hordozó sejt látható. Az egyik sejtben két 9-es kromoszóma szignált és egy 9p21 szignál látható ami heterozigóta deléciót jelent, a másik sejt egy 9p21 lokusz és egy 9-es kromoszóma specifikus jelet tartalmaz. A harmadik sejt a 9p21-es lokusz extra kópiaszám jellemző. Az 11.B ábrán a 9p21 régió teljes hiányát, homozigóta delécióját szemlélteti.

A melanoma minták klinikai paraméterei és a 9p21-es eltérések közötti összefüggést elemezve megállapítottuk, hogy a 9-es kromoszóma aneuszómiájának mértéke szignifikánsan eltért a hisztológiai altípusok között. Ezzel szemben, a 9p21-es lokusz alterációnál nem találtunk szignifikáns különbséget a két altípus között. Bár a noduláris melanómákba a lokusz homozigóta delécióját gyakrabban figyeltük meg, a régió többlete.



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

Megfigyeltük, hogy a 2 mm-nél vékonyabb daganatokban a lokusz homozigóta deléciója nem fordult elő. A 9p21 régió hiánya az összes késői stádiumú melanómára jellemző volt. Adatainkat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a 9p21-es lokusz számbeli eltérései nem mutatnak szoros összefüggést a tumorok klinikopatológiai paramétereivel (Fisher teszt).

A 9p21-es régió számbeli rendellenességei mellett, vizsgáltuk azt is, hogy a lokusz kópiaszám eltérései milyen hatást gyakorolnak az itt lokalizálódó CDKN2A tumorsuppresszorgén expressziójára. Tizennyolc melanoma FISH-el és génexpressziós adatait tudtunk összehasonlítani. A kísérletekhez kvantitatív valós idejű PCR technikát alkalmaztunk, kontrollként naevus mintát használtunk. Négy mintában a CDKN2A gén kontrollhoz viszonyított több mint kétszeres expressziós szintjét mutattuk ki. Ezek közül három lézióban a sejtek több mint 65%-a hordozott 9p21 többletet. Kilenc melanómában csökkent a CDKN2A

expressziója, két tumorban a sejtek 71% valamint 91%-a 9p21 homozigóta deléció hordozott. További három tumorban a sejtek 40-70%-ában a lokusz teljes hiányát tapasztaltuk.

FISH adataink alapján megállapíthatjuk, hogy a 9p21-es kromoszóma szakasz vesztese mind progresszió a korai, mind a késői stádiumában lévő primer melanomákban gyakori jelenség, és nagymértékű szekvencia delécióját jelenti. Feltételezzük, hogy más kromoszómális eltérésekkel együtt nemcsak a daganat kialakulásában, de a progressziójában is szerepe van. Eredményeinket összefoglalva, interfázisos FISH analízissel kimutattuk, hogy a 9p21 lokusz deléciója nemcsak melanoma sejtvonalakra jellemző, de gyakori citogenetikai eltérés sporadikus primer melanomákban is. Eredményeink nemcsak megerősítik az eddigi irodalmi adatokat, hanem bizonyítékot is szolgáltatnak arra, hogy a lokusz deléciója kilóbázis nagyságú már a korai stádiumú daganatokban is.

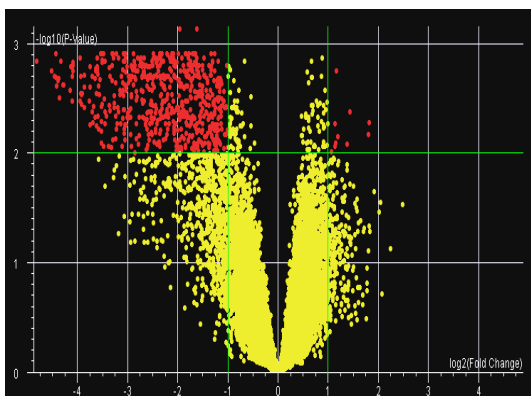
Eddig nem közölt új megfigyelés, hogy a 9p21 tumorszuppresszor lokuszban nemcsak a deléciója hanem a kismértékű amplifikációja is jelen van a melanoma mintákban.

Malignus melanomák génextpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával

Kísérleteink során célunk volt primer melanomák és metasztázisok globális génextpressziós mintázatának vizsgálata microarray technikával, a génextpressziós változások és a daganatok klinikai viselkedése közötti kapcsolat elemzése (14). A kísérleteinkhez az Affymetrix cég által kifejlesztett humán Genechip U133 2.0 plus array-t használtuk, 43 tumor (37 primer melanoma, 6 metasztázis) génextpressziós mintázatát elemeztük. Eredményeink közül az alábbiakat emeljük ki:

Melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő génextpressziós változások

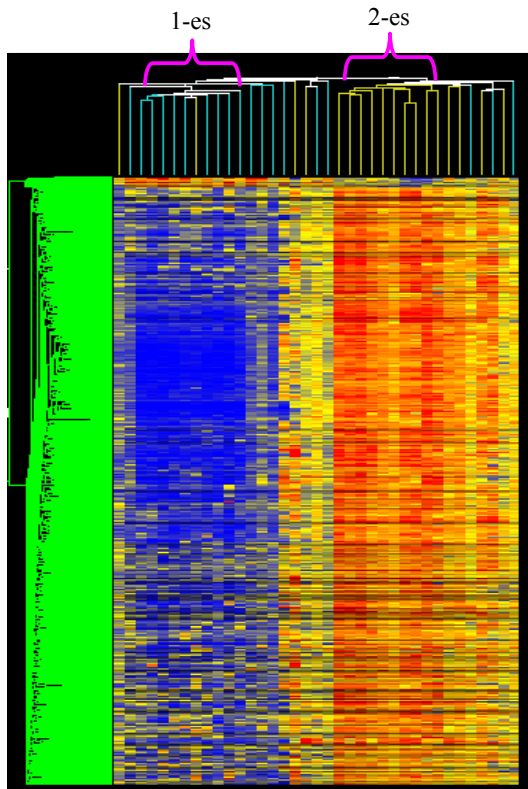
Elemzéseink ezen szakaszában a primer tumorokat klinikopatológiai tulajdonságaik alapján csoportokra osztottuk. Az egyes csoportokon belül az ún. „Volcano plot” elemzést alkalmaztuk, amely lehetőséget ad egy lépésben a minimum kétszeres expressziós különbséget mutató gének kimutatására úgy, hogy közben jelöli a szignifikáns mértékben eltérő expressziójú géneket is ($p < 0,05$, „Benjamini and Hochberg false discovery rate”). A statisztikai analíziseknél az egyes gének csoportokon belüli átlagintenzitási értékével dolgoztunk. Elemeztük a daganatok kor, nem, Breslow vastagság és Clark szint kategóriák szerinti megoszlásával, valamint a felszíni kifeléyesedéssel (ulceráció) és metasztázis képzéssel összefüggő génextpressziós változásokat. Az egyes klinikopatológiai csoportok között szignifikánsan eltérő expressziójú géneket csak a metasztázis képzés és a daganatok felszínének kifeléyesedése alapján képzett csoportoknál tudtunk kimutatni.



11. ábra „Volcano plot” elemzés: felszíni kifeléyesedés alapján csoportosított daganatok között szignifikáns mértékben eltérő gének azonosítása. A vízszintes zöld vonal a $p=0,05$ értéket, a függőleges zöld vonal a $2x$ génextpressziós szint változást jelöli. A különböző színű pontok a géneket reprezentálják, pirossal vannak jelölve a min. kétszeres expressziós különbséget mutató szignifikáns mértékben eltérő gének.

Meglepő, hogy a rosszabb prognózisú ulcerált mintákban a gének nagyrészenek alulműködését figyeltük meg, ugyanakkor ezen gének megnövekedett expressziója jellemezte a jobb prognózisú mintákat. A jobb áttekinthetőség érdekében az 1095 transzkript mintánkénti expressziós mintázatát hierarchikus klaszter analízissel vizsgáltuk.

A két listában szereplő gének 90%-ban megegyeztek egymással. Ennek magyarázata, hogy a microarray vizsgálatokban tanulmányozott 37 primer melanoma minta közül a 2 éves követési idő alatt 7 metasztázist képzett lézió egyben ulcerált felszínnel is rendelkezett. Így a továbbiakban az elemzéseinket az ulcerációval összefüggő génextpressziós változásokra fókuszáltuk.



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

A daganatok kifekélyesedése rossz prognózissal társul, jelenléte nyirokcsomó áttétek kialakulásának valószínűségét növeli. A prognosztikus faktor fontosságát tükrözi a 2002-es TNM- beosztásba való bekerülése is. A daganatok felszínének kifekélyesedéséhez társuló szignifikáns mértékű génextpressziós változást 1095 génnél mutattunk ki „Volcano plot” elemzéssel.

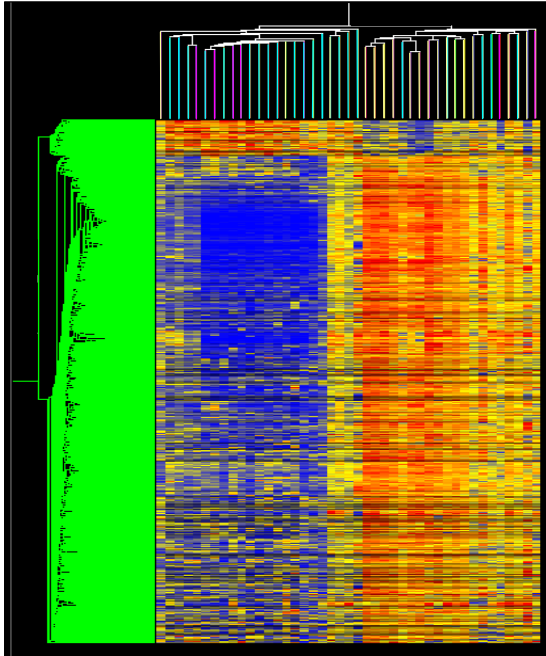
A génlista valamint a daganatok klaszter analízisével a hasonló expressziós profillal rendelkező géneket és mintákat csoportokba rendeztük, az egyes minták expressziós mintázatának hasonlósági fokát dendrogramon ábrázolva.

Melanoma metasztázisok génextpressziós mintázata

Hat melanoma metasztázis génextpressziós mintázatát elemeztük microarray technikával. T-tesztel vizsgáltuk a primer melanomák és a metasztázisok közötti génextpressziós különbségeket. Nem találtunk szignifikáns eltérést a metasztázisokban a primer lézióhoz képest. Ez azzal magyarázható, hogy mind a primer tumoroknál mind a metasztázis melanomáknál az egyes léziók expressziós mintázata eltér egymástól, nem egységes.

Mivel a program a statisztikai elemzéseknél a gének csoporton belüli átlagintenzitásával számol, így a konkrét különbségek nem kerülnek felszínre, ezért a metasztázisokat klaszter elemzéssel hasonlítottuk a primer melanomákhoz az ulcerációval összefüggő génlista alapján (1095 gén). Megfigyeltük, hogy a metasztázisok (dendrogramon lila színnel jelölve) közül

négy génextpressziós mintázata szoros kapcsolatban áll a rossz prognózisú primer melanomák mintázatával, mind a négy nyirokcsomó metasztázis. A négy metasztázisban, a primer léziókhöz hasonlóan, a vizsgált gének nagyrésze csökkent expressziós szinttel rendelkezett. A további két, kután metasztázis expressziós profilja a jobb prognózisú melanomák expressziós mintázatával mutat hasonlóságot. A rossz prognózissal jellemezhető primer melanomák génextpressziós mintázata hasonló a nyirokcsomó metasztázisok génextpressziós profiljához (13. ábra).



13. Ábra Primer melanoma és melanoma metasztázis minták klaszter diagrammja az ulcerációval összefüggő 1095 gén lista szerint. A dendogrammon két függőleges vonal az ulcerált, sárga a nem ulcerált, lila a metasztázis melanoma mintákat jelzi.

A fenti analízisekkel kapott génlistákon kívül az 1095 gén intenzitásértékeinek átlaga alapján meghatároztuk a két klaszterben a legmagasabb fluoreszcencia intenzitási értékkel rendelkező (10-10) géneket is. A rosszabb prognózisú csoportba tartozó mintákban, hasonlóan a PCA analízis eredményéhez, a legmagasabb intenzitási értéket az osteopontin (OPN) génnél figyeltünk meg. A jobb prognózisú melanomákban a legnagyobb intenzitási értéket a defensin beta,

a keratin 16 és az IL1F7 géneknél mutattunk ki.

A gének funkcionális analízise

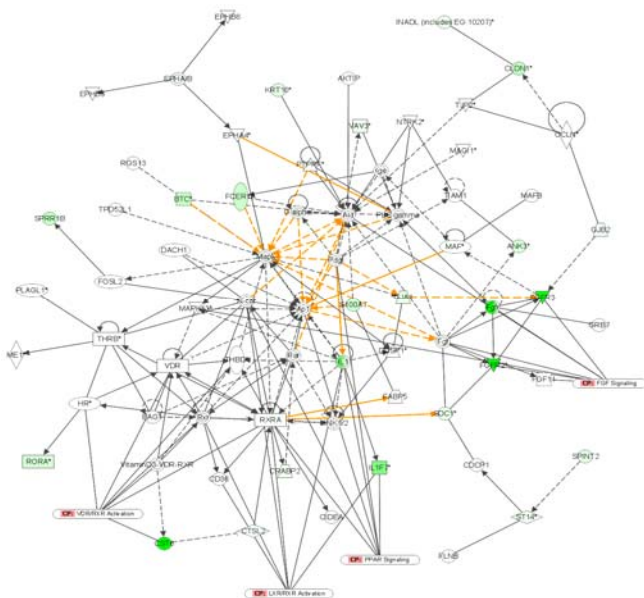
További elemzéseinkben vizsgáltuk a melanoma minták felszíni kifelégyesedésével összefüggő szignifikáns mértékű expressziós eltérést mutató gének (1095) sejt életében betöltött szerepét az interneten hozzáférhető „Ingenuity Pathway Analysis 5.01 (IPA) és Database for Annotation Visualization and Integrated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

Az analízis első lépéseként az agresszív viselkedésű melanomákban megemelkedett expressziós szinttel rendelkező gének jelátviteli útvonalakban betöltött szerepét vizsgáltuk DAVID programot használva. A módszer nagy előnye, hogy az összes jelenleg használt szignalizációs útvonalat tartalmazó adatbázisban keresi a gének funkcióját. A fokozott expressziót mutató 74 génből a DAVID program a gének Affymetrix kódja alapján 67 gént azonosított, melyből 22 gén tartozik az ismert jelátviteli útvonalakhoz (KEGG).

Az analízált gének többsége, különböző receptor mediált jelátviteli folyamatokban játszik szerepet, pl: JAK-STAT, TGF-béta és a Toll-like receptorok által szabályozott molekuláris hálózatokban. A citokin útvonalhoz a listából több gén is tartozik: CCL3L3, CCR1, EPOR. A legmagasabb fluoreszcencia intenzitási értékkel rendelkező osteopontin gén a fokális adhézió, sejt-kommunikáció és extracelluláris mátrix kölcsönhatását szabályozó folyamatokban vesz részt. Az adherens kapcsolatokra az osteopontin génen kívül az shc, syndecan 3 illetve a catenin is hatást gyakorolnak.

Az IPA adatbázisa az eddig ismert összes gén-gén kölcsönhatást, a gének jelátviteli és funkcionális folyamatokban betöltött szerepét tartalmazza, és ezen információk alapján alkot csoportokat a génlistában szereplő génekből. A különböző funkciók kialakításában, fenntartásában számos jelátviteli folyamat együttesen működik közre.

A csoportokban szereplő gének a bőr- szőrfejlődésben, a sejtciklus, sejtsztódás, sejt-sejt interakció, a sejtmozgást szabályozó valamint a kardiovaszkuláris rendszer fejlődésében szerepet játszó útvonalakhoz tartoznak, továbbá különböző metabolikus folyamatok résztvevői. A táblázatban szereplő első négy funkcióban (bőr- és szőrfejlődési funkció; sejt-és szervfejlődés, bőr- és szőrfejlődési funkció dermatológiai betegségek; daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek; génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat) résztvevő gének kölcsönhatását részletesen is tanulmányoztuk.



14. ábra Daganat, sejt szignalizáció, fejlődési rendellenességek; Génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat betegségek csoportba tartozó gének hálózata. Zöld szín a gének alulműködését, a szín erőssége a „fold change” érték növekedését jelöli. A folytonos vonallal a direkt hatást, a szaggatott nyíllal a gének indirekt interakcióját ábrázoltuk.

Az IPA analízissel kimutattuk, hogy a gének többsége elsősorban a p53, NF-kB, WNT/ β-catenin kaszkádoz kapcsolódik. A hálózatban a CDKN2A, TP63, NFkB, gének játszanak központi szerepet (14. ábra). A vizsgált gének

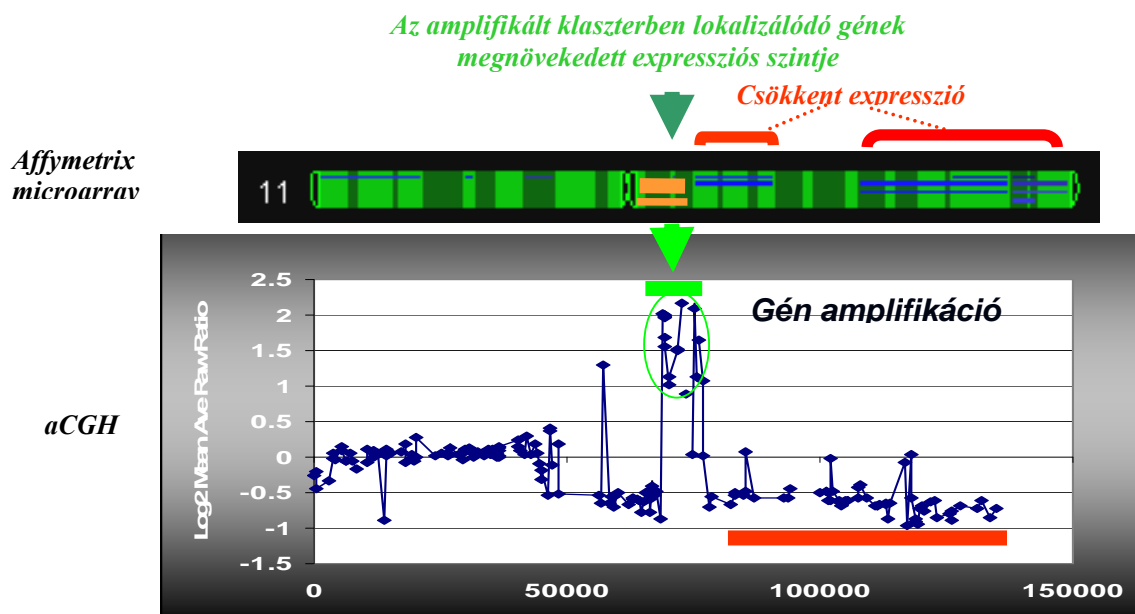
közül a fent említettekkel kapcsolatban lévő gének az ulcerált felszínű, rosszabb prognózisú daganatokban csökkent expressziós szinttel rendelkeznek, ugyanakkor megnövekedett expressziójuk jellemzi a jobb prognózisú daganatokat. Daganat, sejtszignalizáció, fejlődési rendellenességek; génexpresszió, dermatológiai betegségek, daganat betegségek csoportba tartozó gének az FGF, PPAR jelátviteli útvonalakban, továbbá az LXR/RXR és VDR/RXR aktivációban játszanak szerepet, hatást gyakorolva a MAP és AKT kináz kaszkádokra.

Genom eltérések és a génexpressziós változások

Vizsgáltuk, hogy a rosszabb prognózisú melanómákban a gének nagy részénél tapasztalt csökkent kifejeződés társul-e az adott gének deléciójával, illetve az emelkedett génexpresszió milyen genom eltérésekkel asszociálódik. Tizenegy primer és 2 melanoma metasztázisnál tudtuk összehasonlítani az aCGH (BAC array) és génexpressziós adatokat. az interneten hozzáférhető Matchminer programot használtuk. Ezzel lehetőség nyílt, hogy a két különböző array platformon szereplő közös géneket azonosítsuk. A Matchminer program az 1095 génből 593 gén esetében ismert fel olyan forgalomban lévő BAC klónt, melyek az Affymetrix array-en található génspecifikus szakaszokat fedik le. Ezek közül, az általunk használt aCGH platform 16 BAC klónt tartalmaz.

A megemelkedett expressziós szinttel rendelkező gének közül az általunk használt CGH array csak a SULF-1 gént reprezentáló RP11-120N14 BAC klónt (8q13.2) tartalmazta. A csökkent expressziójú gének többsége az egyes kromoszómán az 1p21-22.3, 1p36, 1q21 1q36

régiókon, továbbá a 6p21, 6q21-6q23 valamint a 10q, 11q, 15q22 szakaszokon lokalizálódik. A génkópiaszám változás génexpresszióra gyakorolt hatását szemlélteti a 9-es ábra. Egy noduláris melanómában a 11-es kromoszómán kimutatott, a 11q szakaszt érintő génamplifikáció az itt lokalizálódó gének megnövekedett expresszióját eredményezte. A 11qtert érintő deléció, a gének expressziójának csökkenését vonta maga után, a normál kópiaszámú daganatok expressziós szintjéhez képest.



15. ábra Egy noduláris primer lézió 11-es kromoszóma Affymetrix és aCGH eredményei. Az aCGH profil a 11q13 többletét és a 11qter delécióját ábrázolja. A kromoszómális szakaszokon a narancs színnel vannak jelölve megnövekedett expressziójú gének, a kékszín a csökkent expresszióra utal.

Folyamatban vannak azok a vizsgálataink, melyek az array CGH adatok és a génexpressziós változások közötti kapcsolat pontosabb feltérképezését célozzák meg, nagy felbontású oligo-alapú array CGH chipen (NimbleGen 72k) nyert adatok alapján.

Taqman Low Density Array (TLDA) analízis

A microarray eredményeinket 35 primer melanoma mintán qPCR alapú Taqman Low Density Array alkalmazásával ellenőriztük. Kísérleteink során a microarray analíziseink adataiból kiválasztott 65 gén, továbbá 29 az irodalomban már leírt, a melanoma progresszióval összefüggésbe hozható gént tartalmazó TLDA-n végeztük el, kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és β -actin géneket alkalmaztunk.

A qPCR eredmények jó korrelációt mutatnak a microarray adatokkal. qPCR-al 47 génnél figyeltünk meg az ulcerációval összefüggő minimum kétszeres expressziós változást, ez a változás 25 génnél volt szignifikáns mértékű (4. táblázat). A két melanoma csoport között a legnagyobb expressziós szintbeli változást az interleukin 8 gén esetében figyeltünk meg (119-szoros).

Génexpressziós eredményeinket összefoglalva: primer melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő szignifikáns mértékű expressziós változást csak a daganatok felszínének kifeléelyesedésével (ulceráció) és a melanomák metasztatázisképző tulajdonságával

összefüggésben mutattunk ki. Irodalmi adatok szerint a Breslow vastagság és bizonyos gének expressziója között kapcsolat áll fent. A különböző analízisek eredményei viszont nehezen hasonlíthatók össze, aminek oka, hogy az egyes tanulmányokban eltérő tumor vastagsági kategóriákat alkalmaztak, melyek nem azonosak a TNM klasszifikációban hivatalosan használt Breslow kategóriákkal. Az expressziós eredmények heterogenitását jelzi, hogy a 2000-ben elsőnek közölt, melanoma biopsziákon elvégzett microarray tanulmányban egyik klinikai paraméterhez sem tudtak társítani szignifikáns mértékű expressziós változást.

A rosszabb prognózisú léziókban a legmagasabb expressziós intenzitású átlagértéket (11.82) a 4q21-q25 kromoszómális szakaszon lokalizálódó osteopontin (OPN) génre mutattunk ki. Az osteopontin egy glükofoszfoprotein, mely az integrin útvonalon keresztül befolyásolja a tumorsejtek és az extracelluláris mátrix fehérjéi közötti kapcsolatot, ezáltal hatást gyakorolva a sejt migrációra és a metasztázis képzésre. Legújabb tanulmányok megerősítették megfigyeléseinket, mely szerint az osteopontin melanomák prediktív biomarkere, kiemelve, hogy az osteopontin fontos terápiás target molekula lehet melanomákban.

Az utóbbi években számos munkacsoport különböző metasztatizáló képességgel rendelkező sejtvonalak, valamint eltérő agresszivitású daganat csoportok közötti génexpressziós eltéréseket vizsgálva, a mi eredményeinkhez hasonlóan, kimutatta, hogy a melanoma progresszió korai stádiumában, a jobb prognózisú mintákban a gének fokozott működése, a késői stádiumú mintákban a gének alulműködése jellemző. Ez arra utal, hogy a különböző útvonalakban bekövetkezett specifikus génexpressziós mintázat elvesztése kulcs lépés lehet az előrehaladott stádiumú, rossz prognózisú melanoma kialakulásában.

A kutatási eredmények összefoglalása, a kutatás további lehetséges irányai, az eredmények felhasználásának, hasznosításának lehetőségei:

- I. Megállapítottuk, hogy a melanomák jellegzetes BRAF és NRAS onkogén mutációi a vizsgált primer melanomákban együttesen soha nem fordult elő. BRAF-600 mutációt a primer melanomák 58%-an találtunk, míg az NRAS mutáció sokkal kisebb frekvenciával fordult elő (16%). Array CGH adataink szerint a BRAF mutációt hordozók daganatokban szignifikánsan magasabb a genom eltérések száma hasonlítva a mutációt nem tartalmazó melanomákhoz.
- III. Számos a progresszióval összefüggő genom eltérést találtunk, melyek a legtöbb esetben deléciókat jelentenek.
- II. Megfigyeltük, hogy a krónikus napugárással jellemzhető daganatoknál a génamplifikációk sokkal gyakoribbak a 11q13.4, 20q13.2 és 13q12 lokuszokon, míg a deléciók elsősorban a 3p, 5q és 8p kromoszóma karokat érintik.
- IV. Interfázisos FISH analízissel kimutattuk, hogy az EGFR génkópiaszám többlete, primer melanomákban rossz prognózissal társul.
 - Deléció és kismértékű amplifikáció szignifikánsan nagyobb mértékben fordult elő férfi betegekből származó melanomákban.
 - Az EGFR gén kópiaszáma szignifikánsan magasabb a 4,01 mm-nél vastagabb Breslow vastagságú daganatokban.
 - A követési időn belül metasztázist képző léziókra a gén kis- és nagymértékű amplifikációja egyaránt jellemző elváltozás. A tumorsejtekben kimutatott EGFR extra kópia a betegek rövidebb túlélésével társul.
 - Hasonlóan szignifikáns asszociációt mutattunk ki a daganatok felszíni kifeléyesedése, valamint az EGFR gén többlet között.

- V. Megfigyeltük, hogy a 9p21 deléció gyakori eltérés sporadikus primer melanomákban.
- A 9p21-es lokusz delécióját mind a korai, mind a késői melanomákban megfigyeltük.
 - A 9p21 deléciója mellett a lokusz kópiaszám többletét is kimutattuk.
 - Nem találtunk szoros korrelációt a 9p21-es lokusz genetikai eltérései és a daganatok klinikopatológiai tulajdonságai között.
- VI. Primer melanomák klinikopatológiai paramétereivel összefüggő génexpressziós eltérésekre szignifikáns expressziós változást figyeltünk meg a daganatok felszínének kifehélyesedésével (ulceráció) és a melanomák metasztatizisképző tulajdonságával.
- Ulcerációval összefüggő mRNS szint változást 1095 génnél figyeltünk meg, gének többsége az ulcerált felszínű melanomákban csökkent expresszióval társult. Ugyanezen gének megnövekedett expressziós szintjét detektáltuk a nem kifehélyesedő felszínű melanoma mintákban.
 - A rossz prognózisú melanomákban a legmagasabb expressziós átlagértéket az osteopontin génre mutattunk ki. A jobb prognózisú daganatokban legnagyobb mértékben a defenzin β szintje emelkedett meg, mind az OPN mind a defenzin β az Nf- κ B transzkripció faktor indukcióját okozza.
 - Az ulcerált felszínű melanomákban csökkent expressziójú gének funkcióját vizsgálva kimutattuk, hogy többségük a bőr- és szőrfejlődési funkció, dermatológiai betegségek, daganatfejlődés, sejtsztódás a sejtciklus, sejt-sejt interakció és sejtmitózis szabályozó folyamatokhoz tartozik, a p53, ERK/MAP, IP3/AKT és WNT/ β katenin, Nf- κ B molekuláris útvonalakon hatva.
- VII. Hierarchikus klaszter analízissel kimutattuk, hogy a nyirokcsomó metasztatizisok génexpressziós mintázata rossz prognózissal jellemezhető primer melanomák génexpressziós profiljához hasonló.

Eddigi eredményeink számos olyan kérdést vetettek fel, melyekre a választ már újabb OTKA támogatás keretein belül keressük választ. Olyan fontos molekuláris targeteket „jelöltek ki”, melyek részletes vizsgálatára további kutatási forrásokat keresünk. Elsődleges céljaink között szerepel az aggresszív viselkedés hátterében molekuláris hálózat részletes megismerése.

A kutatás megvalósításához kapott egyéb támogatások: Jedlik Ányos pályázat

„Hozzájárulok ahhoz, hogy a T 048750 OTKA nyílvántartási számú kutatás eredményei alapján készült zárójelentésem, az OTKA Bizottság nyilvánosságra hozza, illetve a tudományos közösség számára ismert, elérhető archívumban archiválja.

Debrecen, 2009. november 30.

.....
Dr. Balázs Margit
témavezető

A kutatáshoz kapcsolódó közleményeink, Ph.D. disszertáció és TDK dolgozatok (2006-2009)

1. Treszl A, Ladanyi A, Rakosy Z, Buczko Z, Adany R, Balazs M. Molecular cytogenetic characterization of a novel cell line established from a superficial spreading melanoma. *Front Biosci* 2006;11:1844-53.
2. Rakosy Z, Vizkeleti L, Ecsedi S, et al. Characterization of 9p21 copy number alterations in human melanoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 2008 Apr 15;182(2):116-21.
3. Szekvolgyi L, Rakosy Z, Balint B, et al. Ribonucleoprotein-masked nicks at 50-kbp intervals in the eukaryotic genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Sep 18;104(38):14964-9.
4. Rakosy Z, Vizkeleti L, Ecsedi S, et al. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *International journal of cancer* 2007 Oct 15;121(8):1729-37.
5. Kovacs T, Bekesi G, Fabian A, et al. DNA flow cytometry of human spermatozoa: consistent stoichiometric staining of sperm DNA using a novel decondensation protocol. *Cytometry A* 2008 Oct;73(10):965-70.
6. Ecsedi S, Rakosy Z, Vizkeleti L, et al. Chromosomal imbalances are associated with increased proliferation and might contribute to bone destruction in cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008 Nov;139(5):635-40.
7. Juhász A, Sziklai I, Rakosy Z, Ecsedi S, Adany R, Balazs M. Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9 correlates with the bone destruction capacity of cholesteatomas. *Otol Neurotol* 2009 Jun;30(4):559-65.
8. Barok M, Balazs M, Nagy P, et al. Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. *Cancer letters* 2008 Feb 18;260(1-2):198-208.
9. Lazar V, Ecsedi S, Szollosi AG, Rakosy Z, Emri G, Begany a, Adany R, Balazs M. Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *Mod Pathol* 2009 Oct;22(10):1367-78.
10. Ecsedi Szilvia A destruktív és nem destruktív cholesteatomák citogenetikai elemzése interfázisos FISH analízissel. 2006. TDK pályamunka.
11. Vizkeleti Laura: A 7q31-es lokusz genetikai alterációi humán malignus melanomákban. 2006. TDK pályamunka.
12. Rákosy Zsuzsa.: Melanoma progresszióval összefüggő genetikai és génexpressziós változások 2008. egytemi Doktori Értekezés, Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskola.
13. Lázár V., Ecsedi S., Rákosy Zs., Vizkeleti L., Tóth R., Treszl A., Bégány Á., Emri G., Ádány R., Balázs M.: Genetic alterations identified in high-risk subgroups also associated with *BRAF* and *NRAS* mutation in primary melanoma revealed by array CGH 2009. (submitted for publication)
14. Rákosy Z, Ecsedi Sz, Vizkeleti L, Ádány R, Balázs M. Gene expression profile of malignant melanoma (2009) submitted for publication

Az OTKA pályázathoz kapcsolódóan több, mint 20 hazai és nemzetközi konferencián és nemzetközi workshopon vettünk részt.