

Melanóma progressziójában szerepet játszó host és tumor eredetű faktorok vizsgálata

Doktori tézisek

Barbai Tamás

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Rásó Erzsébet, Ph.D, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Méhes Gábor, Ph.D, egyetemi docens

Dr. Lászik András, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Lakatos Péter, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, Ph.D, egyetemi tanár

Dr. Patócs Attila, Ph.D, egyetemi docens

Budapest

2016

1. Bevezetés

Az áttétképzés hatásmechanizmusának kutatása az esetek döntő hányadában a tumorprogresszió kaszkádszerűen egymásra épülő folyamatának lépésenkénti vizsgálatára korlátozódik, holott ez is, mint minden biológiai folyamat, olyan komplex, hálózatba szerveződő folyamatok összessége, amelynek lineáris vagy még inkább pontonként történő vizsgálata esetenként több hibát generál, mint amennyi hasznot jelent a tudomány számára. A progresszió állomásai a vizsgálatok során alapvetően két irányba, tumor és host oldalra válnak szét, ahol az előbbi a szakirodalom tanúsága szerint jóval nagyobb hangsúlyt kap. A két oldal azonban nem választható el élesen egymástól, hiszen a tumorsejtek és az őket körülvevő mikrokörnyezet kölcsönhatása az, amely nemcsak lehetőséget ad a primer tumor növekedésére, de végül elvezet az áttétképző populációk szelekciójához. Ez hozza létre az úgynevezett metasztatizáló niche-t, amely az extracelluláris mátrix átrendeződése, a növekedési faktorok termelésének és tárolásának megváltozása, valamint a kemokin környezet átalakulása révén megváltoztatja a strómális sejtek (elsősorban a fibroblasztok) aktivitását és mindez végül az angiogén fenotípus és a migrációs potenciál megszerzésén keresztül a progresszió útjára indítja az ily módon szelektálódott sejteket. Számos kísérletes adat azt igazolja, hogy – meglepő módon - ez a lokális komplexum és az általa közvetített (kémiai) információ az, amely, a távoli áttétek helyének premetasztatikus illetve metasztatikus fenotípusát kialakítva lehetővé teszi az odáig eljutó tumorsejtek számára hogy új (áttéti) utódpopulációt hozzanak létre.

A molekulák amelyek szerepet játszanak a tumorprogresszióban

- **Kemokinek**

A kemokinek kis molekulású fehérjék, melyeket speciális G-protein kapcsolt sejtfelszíni receptorok kötnek meg. Szerepük számos területen kulcsfontosságú, úgymint migráció, gyulladásos folyamatok, immunválasz kialakítása, tumorok növekedése. Csoportosításuknak alapja a protein C terminálisánál található ciszteint tartalmazó reziduum mintázata, mely alapján négy nagy csoportba oszthatóak: CXC, CX3C, CC és C, mely esetben a C ciszteint míg az X egyéb aminosavat jelöl. Funkció szerint pedig gyulladásos és homeosztatisz citokineket különíthetünk el. A nevezéktan nem egységes, ezért külön figyelmet kell fordítani az egérben és emberben megtalálható molekulák azonos voltának ellenőrzésére. A kemokin rendszer számos tagjáról beigazolódott, hogy szerepet játszik a tumorprogresszió folyamatában nevezetesen a tumornövekedésben, a migrációban, az angiogenezisben valamint az epithelialis-mesenchymalis tranzícióban (EMT). A fiziológiás körülmények között a leukociták migrációjának irányításában szerepet játszó kemokinek számos esetben hasonló funkciót töltenek be a tumorsejtek szervspecifikus áttétképzésének létrehozásában. A legtöbbet tanulmányozott CXCR4/CXCL12 rendszer esetében a CXCR4-et (over)expresszáló tumorok fokozott áttétképzést mutattak azon célszervekbe (többnyire a nyirokcsomókba) amelyek CXCL12 expresszánsok voltak. Ezt az összefüggést több tumor esetén (pl.: emlőrák, kolorektális, prosztata, melanóma) is sikerült kimutatni.

Ugyancsak egyértelmű összefüggést mutattak ki a CCR7 expresszió és a nyirokerekben át a nyirokcsomókba irányuló áttétképzés között szájüregi rákok, NSCLC és melanómák esetében. Rágcsáló izograft rendszerben a B16F10 melanómát hordozó állatokban figyelték meg, hogy CCR7-et de novo expresszáló tumorok esetén nyirokcsomó áttétek, míg CCR7 expresszió hiányában tüdőmetasztázisok alakultak ki. Ugyanezt a jelenséget humán klinikai mintákon is igazolták. Hasonló összefüggés figyelhető meg a nyirokkeringés útján létrejövő áttétképzés és a CXCR3 expressziója között. Nevezetesen B16F10 melanóma egérmodellben kimutatták, hogy a CXCR3 expresszió elvesztése 15%-al csökkentette a nyirokcsomó áttétek előfordulását. A kemokineknek a melanómák áttétképzésének targetálásában betöltött szerepét jó példázza, hogy a primer tumor magas CCR9 expressziós szintje a vékonybélbe történő metasztatizálást, míg a fokozott CCR10 expresszió a bőráttek megjelenését segítette elő.

A 17-es kromoszóma hosszú karján található kemokin klaszter eleme a CCL8 gén is, amely mint a családjukra jellemzően szekretált protein terméke immunregulátoros és gyulladással kapcsolatos folyamatokhoz köthető. Több alternatív néven is megtalálható a szakirodalomban, úgymint: CCL8; CCL-8; SCYA8; MCP-2; HC14; Chemokine C-C-Motif Ligand 8; Small Inducible Cytokine Subfamily A(Cys-Cys)Member 8. A CCL8 protein egy 109 aminosavból álló prekuzorként szintetizálódik, melyből érési folyamat során hasítással jön létre az érett 75 aminosavas forma. Az általunk részletesen vizsgált, régebbi nevén MCP 2-nek nevezett CCL8 molekulát a gyulladással kapcsolatos reakciókban monocita ill. T-limfocita attraktáns tulajdonsága miatt vizsgálták. A CCL8-nak egérben megtalálható homológja a CCL12, mely közel 60% egyezést mutat humán megfelelőjével. A CCL8-nak mint a kemokin rendszer tagjának kevésbé ismert daganatok progressziójában betöltött szerepe. Sejtek felszínén megtalálható receptorai a CCR1, CCR2 és CCR5 melyek egyaránt a CC kemokin receptorok családjába tartoznak.

- **miRNS-ek**

A miRNS-ek metasztatikus kaszkád több folyamatának irányításában is fontos szerepet játszanak, elsősorban egyes kulcsgének expressziójának szabályozása útján. Kísérletes vizsgálatok tanúsága szerint a miR182 ektópiás expressziója stimulálta melanóma sejtek *in vitro* és *in vivo* migrációját, down regulációja viszont serkentette annak apoptózisát és csökkentette az inváziós potenciált. A migráció serkentését ez a miRNS a MITF represszállásán keresztül valósítja meg. Klinikai minták tanulmányozása során azt találták, hogy a miR30b/30d felülszabályozása szoros kapcsolatot mutatott a melanómák metasztatikus potenciáljával, a kiújulási idővel, valamint a csökkent teljes túléléssel. A metasztatikus viselkedést a GALNT7-en keresztül az immunszuppresszív IL10 szintézis növelésével érte el [44]. A miR1908, 199a-5p és 199a-3p szerepét szintén kimutatták az invázió, kolonizáció és angiogenezis szabályozásában egér xenograft rendszerekben.

A miR214 migrációt stimuláló valamint áttétképződést elősegítő hatását *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel is igazolták, ami jól korrelált azzal a megfigyeléssel, hogy emelkedett expressziója műtéti mintákból származó humán melanómák esetén is detektálható volt. Áttétképző és áttétet nem adó humán klinikai melanóma mintákban mért miR532-5p expresszió összevetésével sikerült annak az áttétképzésben betöltött szerepét igazolni.

Ugyanezen vizsgálatok szerint ezt a hatást a RUNX3 regulálásán keresztül fejt ki. A metasztázis propagálásán kívül az azt szupresszáló hatású mikro RNS-eket is leírtak. Így a miR34 családba tartozó miR34a/c-t, amely fokozott expressziója a p53 molekulán keresztül fejt ki a tumorsejtek invazív és generatív potenciálját csökkentő hatását. A primer melanóma proliferációjának és áttétképző képességének csökkenését figyelték meg miR200c-t overexpresszáló állatkísérleti modellrendszerben, s ezt a hatást klinikai mintákon a metasztatizáló és nem metasztatizáló primer tumorok összevetése során is kimutatták.

- **Kollagén XVII**

A szöveti környezet intakságának fenntartásában elengedhetetlen szerepük van az epiteliális sejtek és extracelluláris mátrix közötti kölcsönhatásnak, melynek egyik alapvető funkciója az epithelium alaphártyához történő kihorgonyozása. A mátrix és sejt elemek közötti kapcsolat számos ok miatt módosulhat, ezáltal változtatva meg az adott szövet funkcióját. Az integrin fehérjecsald tagjai közé tartozik a kollagén XVII is mely legalább öt tagjával képviselteti magát a sejt mátrix kapcsolatok kialakításáért felelős molekulák között. A kollagén XVII egyike azon transzmembrán proteineknek, melyek az alaphártyához horgonyként rögzülnek. A globuláris N-terminális fejrész a hemidezmoszómák által alakított plakkk területén, míg a C-terminális fark régió az alaphártyához kötődik. Az egész molekuláris tartószerkezet a citoskeletonhoz kötődik. A mátrix-sejt kapcsolat hemidezmoszómás kialakításában kapcsolódik még a laminin-332-höz, amit korábban laminin-5-nek neveztek, valamint a kollagén-4-hez is. A kollagén XVII ellen termelő autoantitesteket írtak le bullózus pemphigoidban. A mátrix horgonyként funkcionáló 120kDa-os molekulát fiziológias körülmények között az ADAM9 és 10 metalloproteáz hasítja, s ezáltal egy 60kDa-os endodomén marad. A kollagén XVII expressziója fiziológiásan a keratinociták differenciálódásához köthető, de expresszióját detektálták velósánc (neural crest) eredetű sejteken, többek között melanocita hiperplázia esetén, valamint laphámrákok (squamous cell carcinoma) és duktális pankreász rákok esetében is. A kollagén XVII protein ekto és endodoménje egyaránt expresszálódik proliferáló melanocitákban. A 60kDa-os endodomén akkumulációja pedig melanómákban volt megfigyelhető.

- **CD44**

A sejtek felszínén található CD44 glikoproteint először T-limfocitákon mutatták ki. A molekula evolúcionálisan meglehetősen konzervált, melynek bizonyítéka, hogy egér homológjával közel 80%-os egyezést mutat. A 20 exont tartalmazó génben 10 variábilis exon található, melyeket két oldalról 5-5 nem variábilis exon fog közre. A variábilis exonok szintjén megjelenő változékonyság az alternatív splicing iskolapéldájának is tekinthető, az egy génről képződő variánsok széles spektrumát tekintve. Az elsősorban hámokban és hematogén szövetekben megtalálható standard CD44 a variábilis exonokból egyet sem, vagy csak az 1-es variábilis exont tartalmazza, ezzel szemben a daganatokban a variánsok gazdag populációját lehet megtalálni. A CD44 molekula protein szintű felépítésében a variábilis régiót tartalmazó domén extracellulárisan a membrán közeli részeken helyezkedik el. A CD44 extracellulárisan heparán szulfáttal, hialuronsavval valamint egyéb poliszaharidokkal glikanálódni képes. A sejt-sejt, sejt-mátrix egyik strukturális glikozaminoglikánja a hialuronsav, melynek gyengült

kötődése figyelhető meg malignus daganatokban előforduló CD44 splicing variánsok esetében. A normál epidermális differenciációban a szöveti struktúra megőrzött, mely a progresszió útjára lépett differenciálatlan tumorszövetben felbomlik (EMT jelensége). A progressziós folyamat egyik meghatározó eleme a standard CD44 molekula mellett az új splicing variánsok megjelenése.

2. Célkitűzések

- Velezületetlen immunhiányos egerekbe (NSG, *scid*) implantált humán melanómák strómális (host eredetű) komponenséhez köthető génexpressziós változások azonosítása a daganat progressziója során 20.000 gént reprezentáló expresszió chip segítségével
- A szignifikáns változást mutató, a progresszióban potenciálisan szerepet játszó molekulák állatkísérleti és humán klinikai primer melanóma tumormintákon történő validációja,
- azoknak a tumorsejtek migrációs és proliferációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata illetve
- a tumor-host kölcsönhatás mechanizmusának *in vitro* modellezése a kooperációt szimuláló rendszerben
- Ugyanezen modellben 800 miRNS profiljában bekövetkező, a tumorprogressziót jellemző mennyiségi változások meghatározása valamint a legnagyobb változást mutató molekulák esetleges prognosztikus jelentőségének igazolása humán klinikai mintákon
- Egy, hipotetikusan az áttétképzéssel asszociálható molekula a kollagén XVII expressziós sajátságainak változása kísérleti modellünkben a xenograft humán melanóma progressziója során
- Az alternatív splicing, mint daganatos progresszióval asszociálható jelenség tulajdonságainak vizsgálata egy, az izoformák átlagosnál is nagyobb számát felvonultató molekula a CD44 segítségével

3. Módszerek

Állatkísérleti modell rendszer Kísérleteinket xenotranszplantációs modellekben végeztük, a C57Bl/6 egerekben létrejött (B6; 129S7-Rag1tm1Mom/J) mutációt hordozó *scid* (severe combined immunodeficiency) beltenyésztett egértörzs tagjaiba humán eredetű tumorsejt szuszpenziót implantálunk. A kísérleti felállásnak megfelelően egyidőben szubkután implantáltunk humán melanóma tenyészetből származó sejteket újszülött valamint felnőtt *scid* egerek hátbőre alá. Az eltérő host eltérő eredményeket produkál, ugyanis míg az újszülött egyedekben mindig, felnőtt állatok esetében viszont sosem tapasztaltuk tüdőáttétek megjelenését.

Egysejtszuszpenzió előállítása Az implantálásra szánt konfluens humán melanóma sejtek tenyészetéről EDTA-val eltávolítottuk a tápoldat maradékát, majd friss EDTA oldatban történő rövid inkubációval megszüntettük a sejtek egymás közt és a tenyésztőedénnyel szemben fennálló adherenciáját, s a letapadt sejtek szuszpendálhatóvá váltak. Az EDTA centrifugálással történő eltávolítását követően a sejteket 1ml RPMI 1640 médiumba vettük fel. A sejtszámot s egyben a sejtek viabilitását Bürker kamrában történő számlálással határoztuk meg.

Tumor implantáció Humán melanóma sejtvonalak (HT199, HT168M1, WM983B) fentebb leírt egysejt- szuszpenzióját 106/50 μ l-es koncentrációban szubkután injektáltuk az állatok hátbőre alá. A kontrollként kezelt állatok megegyező mértékű tumormentes oldatot kaptak. A kísérletek terminálását az implantációt követő 30. napon Nembuthal narkózisban végeztük el. A centrális vér nyérése szintén Nembuthal narkózis alatt történt, melyet autopszia követett.

Az állatok tartása és a folytatott állatkísérletek kivitelezése a hatályos törvényi és etikai feltételeknek megfelelően zajlottak.(TUKÉB 83/2009)

Sejttenyésztés A tumorsejtvonalakat (HT199 mely a SE I. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézetében lett izolálva a HT168 és HT168M1 melyek egyaránt az A2058 kísérleti derivátumai, a WM983A és WM983B melyek M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA) valamint A2058 LA Liotta (NCI, Bethesda, MD) ajándékai) CO₂ termosztátban 37°C-on RPMI 1640 (Lonza) tápfolyadékban tenyésztettük, mely 10%FCS-t 1% penicillin/streptomycin-t tartalmazott. A nem tumoros sejteket: melanocita (C-12403), keratinocita (C-12003) és dermális fibroblaszt (C-12360) (Promo Cell) primer vonalakat a gyártó által javasolt médiumokban antibiotikum hozzáadása nélkül tartottuk.

Primer tenyészetek létrehozása Az *in vivo* kísérletekből származó xenograft tumorok humán komponenseinek vizsgálatához szükségünk volt azok strómális sejtek nélküli tenyészetére. A tenyészeteket újszülött állatok egyfókuszú tüdőmetasztázisából valamint primer tumorából és a felnőtt állat szubkután primer tumorából mechanikai aprítást követően 6 lyukú sejttenyésztő lemezen inkubáltuk (RPMI 1640 (Lonza), 10%FCS (Sigma), 1%penicillin/streptomycin (Sigma)) tenyésztőfolyadékban. A sejtek letapadása után mosással

eltávolítottuk az elhalt szövetdarabokat, majd a növekedésnek indult kultúrát 2-3x -i passzálassal mentesítettük a nem tumoros sejtes komponensektől. Keringő tumorsejtek tenyésztését a kísérleti állatok terminálása során a szívből direkt punkcióval kivett vérmintából alapítottunk. Az EDTA-val kezelt vérminta 96 lyukú mikrotitráló lemezre történő szélesztése után többszöri mosást követően a mintában található kitapadt cirkuláló tumorsejteket nagyobb edénybe történő passzálassal szaporítottuk fel.

Proliferációs vizsgálat (MTT teszt) A sejteket a vizsgálat megkezdése előtt 24 órával 96 lyukú mikrotiter plate-re tettük 100ml-es térfogatokban 6000sejt/ml-es koncentrációban. A rekombináns humán CCL8-al (RnD systems) történő kezelést különböző koncentráció tartományokban végeztük (50pg/ml,500pg/ml,1ng/ml) el. A 12 órás inkubációs idő leteltével a kezelés hatását MTT teszt segítségével tettük kvantitatívvá, melynek alapja, hogy a metabolikusan aktív sejtek endocitózissal felveszik a tetrazólium kristályokat és formazánná alakítják át. A sejteknek ezt a formazán tartalmát DMSO-ban oldva 570nm-en fotometriával Bio-Tek Microplate Reader (Merck) detektáltuk a kontroll és a kezelt sejtek esetén. Az abszorbancia arányos az élő sejtek számával.

A kollagén XVII kezelés IgG2b kontroll alkalmazása mellett történt 1:25, 1:50 és 1:100 arányú hígításban alkalmazva a 0,25mg/ml-es koncentrációjú 9G2 antitestet. Az antitest felismerő régiója az endodómén extracelluláris részénél található (AA507-529)

In vitro migrációs assay A mérést xCELLigence rendszerben (Roche) CIM (Cell Invasion Migration) plate-n végeztük a gyártó előírásának megfelelően. A vizsgálat megkezdése előtt a sejtek konfluens tenyészetéből a sejteket felszedtük majd a vizsgáló lemezre juttattuk a meghatározott mennyiségű sejtet. A vizsgálat során a kezeletlen kontroll tenyészet migrációs aktivitásához viszonyítottuk a kezelésnek alávetett (HT168, WM983A melanóma valamint fibroblaszt és melanocita) sejt vonalakat. A 20000/sejt induló sejtszámmal induló tenyészeteket a hatóanyaggal ekvivalens mennyiségű PBS-sel (kontroll), 1ng/ml valamint 10ng/ml-es koncentrációjú CCL8-al (RnD Systems) kezeltük kétféle stratégia szerint. A vizsgáló plate egy két kamrából álló berendezés melynek alja speciális vezetővel van ellátva mely a sejtek szigetelő hatása lévén fellépő impedanciát méri. A két térfél egymástól egy meghatározott pórusméretű (8µm) membránnal van lezárva, melyen a sejtek aktívan át tudnak jutni. Direkt kezelés során a kemokint a sejtek tápfolyadékába juttattuk. Kemoattraktánsként a sejteket CIM-Plate 16 rendszerben elhelyezve (Roche) a kemokin az alsó kamrában volt a direkt kezelésnek megfelelő koncentrációban. A mérés teljes 25 órás időtartama alatt 5 percenként történt az adatgyűjtés. A sejteket mindkét esetben polyethylene terephthalate (PET) membrán választja el az alsó kamrától és azok a membrán mentén vagy azon keresztül történő mozgását az impedancia mikroelektrodás mérésével tettük kvantitatívvá, melyet az ezzel arányos úgynevezett cell index jelez.

ELISA (Ensim Linked Immunosorbent Assay) Melanómás betegek szérum CCL8 koncentrációinak meghatározására Humán CCL8 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)-et használtunk, a gyártó által mellékelt protokoll szerint. Az első lépésben a 96 lyukú mikrotitráló lemezeket coat-oltuk a CCL8 specifikus antitesttel, majd rövid (3x5min)

mosást követően a betegekből származó minták 100µl-es mennyiségeit hígítatlanul mértük fel, majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk 4°C-on. Minden mintát duplikátumként kezeltünk, melyek átlagával számoltunk a vizsgálat folyamán. Az inkubáció letelte után PBS-sel történő mosást (3x5min) követően a második CCL8 specifikus antitesttel jelöltük (60 min/szobahőmérséklet), majd mosást követően a reakció előhívását a gyártó által mellékelt előhívó rendszerrel végeztük el. Az eredményeket két hullámhosszon mértük 450 és 540nm-en fotometriával Bio-Tek Microplate Reader (Merck) segítségével. Hígítási sorként a kit részét képző rekombináns humán CCL8-at használtunk, melyet szintén duplikálva vittünk fel a mikrotitráló lemezre.

RNS izolálás A mintákból TRI REAGENS (Sima) segítségével a gyártó által mellékelt protokoll szerint totál RNS-t izoláljuk, Az RNS preparátumot 100µL DEPC kezelt vízben oldva -70°C-on tároltuk.

RNS tisztítás Az RNS minták DNázos emésztésével az esetleges genomiális DNS szennyezéstől mentesítjük a mintákat. Az enzimatis tisztításhoz a DNA-free (Ambion) összeállítást használtuk.

Agilent Mouse Oligo Microarray analízis Az általunk használt Agilent Mouse Oligo Microarray 20000 expresszált egér gén kimutatására alkalmas nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai vizsgáló platform. A specificitást a 60bp hosszúságú szilárd hordozóhoz kapcsolt oligonukleotid próbák biztosítják. A vizsgálat során kereszthibridizáció valósul meg, azaz a mérendő mintapárok eltérő festékekkel lesznek jelölve, s a leolvasás során egyszerre detektálják a kétféle fluoreszcens jelet. 5µg totál RNS a kontroll és 5µg totál RNS az újszülött állat primer tumorából lett jelölve Cy5 és Cy3 fluoreszcens festékekkel. A jelölt mintákat 16 órás 60°C-on történő inkubáció alatt hibridizáltattuk, majd Agilent DNA microarray scannerrel olvastuk le. A nyers adatok feldolgozását, mint a háttér felvétele és kivonása, adatpontok lineáris normalizációja az Agilent Feature Extraction Software-vel történt.

Reverz transzkripció A reverz transzkripcióhoz 1µl 10mM dNTP mix (Qbiogene) és 1µl Random primer-oligo dT kombinációt (végső koncentráció: 2.5µM) adunk 2µg tisztított totál RNS-hez. 10 perces 70°C-os inkubáció után 2µl 10X M-MLV Reverse Transcriptase Buffer-t (Sigma), 1µl M-MLV Reverse Transcriptase-t (200 unit/µl, Sigma), 0.5µl RNase Inhibitor-t (40 unit/µl, Ribo Lock Fermentas) és 6.5µl DEPC kezelt vizet adunk (végső térfogat: 20µl) hozzá, ezt követően 50 percig 37°C-on, majd 10 percig 85°C-on inkubáltuk. A reverz transzkripció megtörténtét egér illetve humán β2-mikroglobulin valamint béta-aktin mint housekeeping gén primerekkel végzett PCR reakcióval igazoltuk. Negatív kontrollként és a lehetséges DNS szennyeződés kizárására ugyanazon minta RNS-ét, non-templát kontrollként pedig DEPC-kezelt vizet használunk.

PCR A PCR 25µl végtérfogatban 1.00 pM/reakció primerkoncentráció és AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Life Technologies) a gyártó általi protokoll szerinti alkalmazásával az alábbi paraméterek mellett történt: pre-denaturáció 95°C 10 perc, majd 38 cikluson

keresztül az alábbiak szerint: denaturáció 95 °C 1 perc, primer annealálás 55 °C 1 perc, lánchosszabbítás 72 °C 2 perc befejezésül: 72 °C 4 perc.

q-PCR A célgén expressziójának specifikus mérésére q-PCR-t alkalmaztunk a következő feltételekkel: 25µl reakciótérfogatban 12.5µl 2X ABsolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), 0,5-0,5µl mindegyik primerből 200nM-os végkoncentrációban és 11,5µl hígított cDNS. A reakció feltételei: 8 perc DNS polimeráz aktiváció 95°C-on, 55 cikluson keresztül 95°C 30 sec, 62°C 30 sec és 72°C 1 perc. A vizsgálat tárgyának relatív kiindulási mennyiségét K562, B16 valamint kevert (humán+egér) sejtekből származó cDNS hígítási sorának a vizsgált termék PCR alapján kapott görbe, ill. a saját housekeeping expresszióra való normalizálás alapján végeztük el.

Direkt szekvenálás Vizsgálataink során a PCR reakciók autentikus voltáról a reakciótermékek direkt szekvenálásával győződünk meg. Agaróz gélen megfuttatva, majd a megfelelő band-eket a gélből kiemelve EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic) segítségével izoláltuk vissza a PCR terméket. A szekvenáló reakciót a gyártó utasításainak megfelelően BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ – Life Technologies™) segítségével végeztük el. A minták tisztítását (BigDye® XTerminator™ Purification Kit – Applied Biosystems™ – Life Technologies™) követően a szekvenálási reakció eredményét, azaz a nukleotid szekvenciát 3130 Genetic Analyser-el (Applied Biosystems) határoztuk meg. A minták értékelése NCBI adatbázis használatával történt.

miRNS pool meghatározás nCounter assay (nanoString) segítségével A miRNS pool minőségi és mennyiségi vizsgálatát nCounter assay (nanoString)-vel végeztük. A módszer 800 humán mikro RNS párhuzamos kvantitatív mérésére ad lehetőséget ugyanazon mintából. A kiindulási mintakonzentráció 100ng totál RNS, melyen amplifikáció nélkül történik a mérés, s ezáltal a mennyiségi vizsgálatok pontosabb képet adnak. A detektáláshoz fluoreszcensen jelzett próbákat használva nCounter Digital Analyzer-el történt a kiértékelés. Az adatok normalizálásához a rendszer 6 pozitív és 6 negatív mikro RNS kontrollt használt valamint 5 mRNS kontrollt. A normalizált adatokon az egyes miRNS fajták mennyiségi összehasonlítása az egymáshoz viszonyított változások mértékével valamint a totál miRNS mennyiségekkel egyaránt jellemezhetőek.

Immunhisztokémia Az immunhisztokémiai vizsgálatot FFPE metszeteken végeztük. Deparaffinálás után az FFPE metszetek esetében mikrohullámon történő feltárás (pH 6 citrát puffer) után a blokkolás Image-IT FX Signal enhancer (Amersham) segítségével történt. Primer antitesttel anti CCL8 egér monoklonális AB (Santa Cruz) inkubáltuk egy éjszakán át, 50 x-es hígításban alkalmazva. Az erősen pigmentált humán melanóma minták esetében kálium permanganátos depigmentációt, valamint NovaRED (VECTOR) előhívó rendszert alkalmaztunk.

Apoptózis assay Humán melanóma sejteket 24 lyukú sejtenyésző lemezen tenyésztettünk, 2×10^5 -en kiinduló sejtszámmal. A 80 %-ban konfluens tenyészeteket 9G2 antitesttel kezeltük, A kezelt tenyészetek tápfolyadékát 24 és 48 óra múltával eltávolítottuk, majd a letapadt sejteket EDTA-val felszedtük. A sejteket PBS-ben történő mosást követően 70%-os alkohollal fixáltuk. 30 perces fixációs idő letelte után a sejteket lecentrifugáltuk, majd propídium jodidos festést követően (Partec GmbH, Munster, Germany) az apoptotizált sejtek arányát a normál sejtekhez képest Partec Cy Flow SL készülékkel határoztuk meg.

Statisztikai Analízis A statisztikai analízisek StatSoft Statistica 11 szoftver segítségével történtek. A t próba alkalmazásánál szignifikáns különbséget a $p < 0.05$ szint figyelembevételével határoztuk meg. A viabilitási és migrációs teszteket ANOVA analízissel értékeltük.

4. Eredmények

Humán melanómából származó egysejtszuszpenziót implantáltunk újszülött, inbred, veleszületetten immunhiányos (scid) egerekbe. Azonos korú, tumormentes állatok megfelelő lokalizációjából származó szövetminták génexpressziós mintázatát összevetve a tumorhordozó állatokéval arra kerestük a választ, hogy melyek azok a host eredetű faktorok amelyek kisselektálják a metasztatikus fenotípust az újszülött állatban.

A metasztatikus fenotípus (genotípus) a primer tumort elhagyó azon tumorsejtek sajátossága, amelyek távoli szervekben megtelepedve új kolóniát képesek létrehozni. Ezen geno/fenotípus kétségtelenül egy olyan szelekciós hatásra alakul ki, amelyben a host eredetű mikrokörnyezet döntő szerepet játszik. Modellünkben ennek a kölcsönhatásnak a molekuláris markereit igyekeztünk felkutatni majd ugyanezen modell segítségével a következő lépésben azoknak az áttétképzésben betöltött szerepét igazolni. Kérdéses azonban, hogy a primer tumorban mért expressziós paraméterek alapján levonhatók-e megbízható következtetések a távoli áttétek létrejöttével kapcsolatban. A metasztatizáló és nem metasztatizáló rendszer közötti különbségek vizsgálatával erre a kérdésre is megpróbáltunk választ adni.

A primer tumor egészének vizsgálata során át kell gondolnunk azt a lehetőséget is, hogy az általunk megfigyelt és fennálló eltérések a két csoportunk között (metasztatikus ill. nem metasztatikus) a primer tumor egységes sajátossága, vagy csak a metasztatikus kaszkádba kilépő sejtek kis csoportjának jellemzője. Utóbbi esetben lehetséges, hogy ezen kis csoportban megjelenő, akár nagyságrendben is eltérő változások a teljes mintapopuláció szintjén is szignifikáns mérhető eltéréseket hoznak létre, azaz markerként használhatók az áttétképzés lehetőségének előrejelzésére. Az primer tumorban ötszörösnél nagyobb expressziós különbséget mutató, metasztatikus szelekciós tényezőként számba vehető gének validációja során (Fam 187b, Lass5, DEAD box 60 polypeptide, Gm4262, CCL11, Pex2, Cathepsin L, CCL12 Ninein.) mindösszesen a CCL12 mutatott mindhárom humán xenograft állatmodellben emelkedett expressziót. A CCL8 egérben megtalálható homológja a CCL12, melynek kifejeződését megvizsgáltuk többféle humán melanóma implantációját követően a fent említett modellrendszer segítségével áttétképző valamint nem metasztatikus esetben. A

metasztatikus hostban minden esetben emelkedett CCL12 expressziós szintet detektáltunk. Igazoltuk, hogy a humán melanómák egy kivételtől, az melanóma áttétből kialakított WM983B sejtvonaltól eltekintve nem expresszálják a kemokin humán változatát a CCL8-at. Az implantáció helyén található sejtes (strómális) elemek közül a CCL8 expressziójáért felelős lehetséges komponenseket keresve megvizsgáltuk a dermális fibroblasztok, melanociták és a keratinocitákat CCL8 expresszióját. Közülük a fibroblasztok és a melanociták expresszálták a CCL8 kemokint. A áttétképzés komplex folyamatának vizsgálata során azonban nemcsak az egyes szereplőkre, hanem azok kapcsolatára is gondolnunk kell. A CCL8 hatását csak speciális kemokin receptorok (CCR1, CCR5) közvetítésével érheti el. A host sejtszövetében a fibroblasztokon, míg melanóma sejtvonalak esetén az A2058 és WM983B kivételével minden esetben kimutattuk CCR1 jelenlétét. CCR5 expressziót egyik esetben sem detektáltunk. A primer tumorban kialakuló meghatározott kemokin milieu lokális hatásának vizsgálatára migrációs és proliferációs vizsgálatokat végeztünk. A kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy 500 ng/ml-es CCL8 koncentráció a humán melanómák proliferációját gátolja, amely gátlás a koncentráció emelésével megszűnik. E tekintetben a dermális fibroblasztok viselkedése megegyezik a melanómákkal, azonban az említett hatás mindösszesen egy tumorsejtvonalra és a dermális fibroblasztokra korlátozódott, s így a CCL8 viabilitásra gyakorolt hatásának biológiai relevanciája erősen kérdéses. A CCL8-at közvetlenül a sejtekhez adva a kontrollhoz képest a vizsgált humán melanóma sejtvonalak és a melanociták migrációja visszaesett, ezzel szemben a fibroblasztoké nőtt. Kemoattraktánsként alkalmazva a CCL8 fokozta a tumorsejtek migrációját a kezeletlen kontrollhoz képest, a melanociták migrációját nem befolyásolta a fibroblasztokét pedig gátolta. A migrációs és proliferációs tesztekben vizsgált sejtek mindegyike rendelkezett CCR1 receptorral, mely a kemokin hatásért felelős kötődés alapjául szolgálhat.

Xenotranszplantációs modellünk lehetőséget kínált arra, hogy az áttétképzés folyamatának különböző lépéseiből származó tumorsejtek viselkedését külön-külön vizsgáljuk. Nevezetesen a primer tumorból, a keringésből és a tüdőáttétekből származó tumorsejteket *in vitro* tenyésztettük tovább, s két-három passzázs után a strómális komponensektől megszabadított tumortenyészeteket tesztelhetjük. Eredményeink azt mutatják, hogy a primer tumorból származó tenyészetek nem expresszálták a kemokint, ezzel szemben a keringésből izolált tumorsejt utódpopulációjában és tüdőáttétből származóban megjelennek a CCL8-at expresszáló klónok. Természetesen mindebből nehéz lenne messzemenő következtetéseket levonni, hisz a keringésben lévő tumorsejt egy olyan „köztes állapotot” képvisel, ami csak lehetőség, de nem biztosíték az áttétek létrehozására. Immunhisztokémiai reakciókkal sikerült a primer tumor területén is kimutatni a CCL8-at expresszáló tumorsejteket, azonban ezek aránya elenyésző volt a teljes tumorsejtpopulációhoz viszonyítva. Ugyanezen tumor primer tenyészetében PCR reakcióval CCL8 expressziót nem tudtunk kimutatni. Szintén érdekes jelenség, hogy a vizsgált sejtvonalak között található primer tumorból származó WM983A nem, ezzel szemben annak nyirokcsomó áttétéből kialakított WM983B sejtvonal sejtszöveti expresszálják a CCL8-at.

Mivel a xenotranszplantációs modelljeinkben mindhárom humán melanóma sejtvonal esetén mennyiségi különbséget találtunk metastatikus és nem metastatikus primer tumor CCL12

expressziójában a strómális komponensek szintjén, megvizsgáltuk, hogy ez a különbség bármely formában detektálható-e humán klinikai mintákon, távolabbi célként használható-e a progressziót előre jelző faktorként.

Melanómát hordozó betegek mintáit két csoportra (nem metasztatikus, ahol öt év követési idő során a betegnél áttétek kialakulását nem tapasztaltuk és metasztatikus, ahol a betegben öt éven belül áttétek alakultak ki) osztva értékeltük ki. E betegek szérumában ELISA teszttel mértük a CCL8 kemokin mennyiségét. Mindkét csoporton belül elkülönült egy alacsony és egy magasan expresszáló alcsoport. Az expresszió mértéke azonban a nem metasztatikus csoportban magasabb volt, mint a metasztatikus csoportban. A statisztikailag is igazolható különbség kimutatásához azonban a későbbiek során nagyobb esetszámra lesz szükség.

A primer tumorok CCL8 expressziója közti különbséget mérve első közelítésben az áttétet nem hordozó betegek mintái és a távoli áttéttel bíró betegek mintái között nem találtunk különbséget. Ebben az összehasonlításban az áttét lokalizációjától függetlenül valamennyi áttéthordozóból származó primer tumor adatait vetettük össze a nem metasztatikus betegek primer tumorából származó CCL8 expressziójával. Azonban elkülönítve összevetve a tüdőáttétekkel rendelkező betegek primer tumorának kemokin expresszióját a nem metasztatizálók valamint májáttétekkel rendelkezőkével a különbség már szignifikánsnak bizonyult. A CCL8 hatás közvetítésében szerepet játszó receptor, a CCR1 expressziós szintjében a primer tumorok nem mutattak eltérést, azaz közel azonos expressziós szinttel rendelkezik az áttétet hordozó és az áttétektől mentes betegek primer tumora. A csontáttéttel rendelkező betegek primer tumorának CCL8 expresszióját májáttéttel rendelkező betegekével összehasonlítva szintén szignifikáns különbséget mértünk, mindeközben viszont a CCR1 receptor expresszióban nem következett be változás.

Annak tisztázására, hogy ez az expresszió a tumorsejtekhez, vagy a strómális sejtekhez köthető immunhisztokémiai reakcióval vizsgáltuk a CCL8 protein megjelenését a klinikai mintákban. A pozitív sejtek aránya alacsony volt, és a stróma mellett a tumorokban is detektálható volt. A kisszámú CCL8 expresszáló sejt inkább lokális, mint egész tumorra kiterjedő hatásra enged következtetni.

Kísérletes modellünkben a strómális sejtek kemokin termelése a metasztatikus hostban magasabb volt, mint a nem metasztatikus host esetében. Humán primer tüdőáttétet okozó melanómák esetében azonban ez a reláció megfordult, és a nem metasztatikus primer tumorban találunk nagyobb mértékű kemokin expressziót. Ennek okát egy *in vitro* modell segítségével próbáltuk kideríteni.

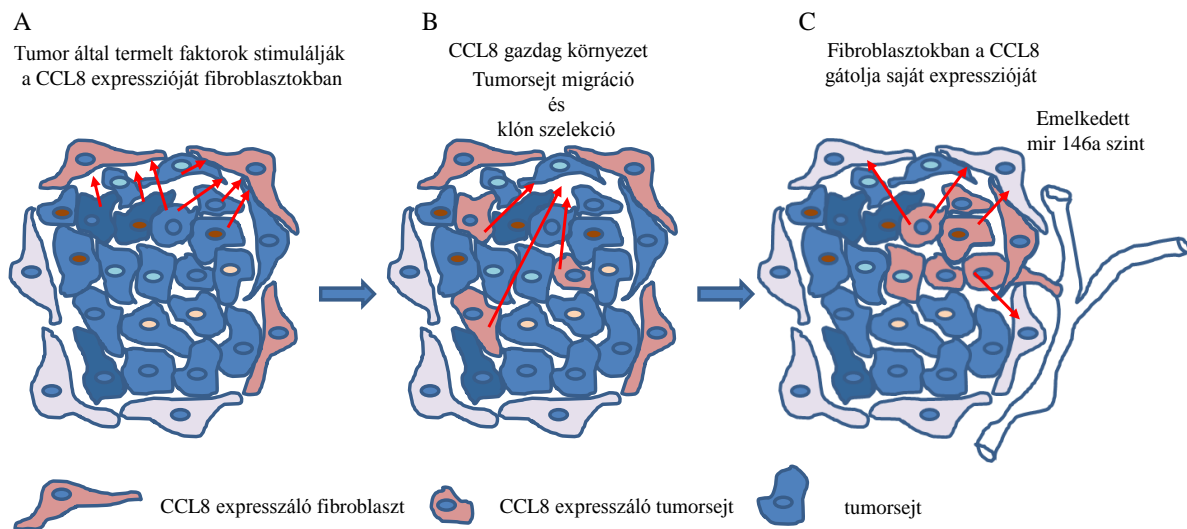
A tumorsejtek és az őket körülvevő strómális sejtek kooperációját a stróma szempontjából oly módon modelleztük, hogy humán dermális fibroblaszt tenyészetet humán melanóma (HT199) valamint humán leukémia (K562) sejtenyészetek felülúszójával kezeltük és valósídejű PCR segítségével mértük, hogyan változik annak CCL8 expressziója. A kontrollként szerepelt olyan tenyészet is, amely tiszta formában kapott rekombináns humán CCL8-at. Mindkét humán tumor felülúszójával történő kezelést követően a humán dermális fibroblasztok CCL8 expressziója szignifikánsan megemelkedett. Ezzel szemben a direkt CCL8 kezelés hatására a fibroblaszt saját CCL8 expressziója szignifikánsan csökkent.

A fentebb bemutatott kezeléseket követő hatások kialakulásának időfüggése arra utalt, hogy a kemokin termelődést a transzkripció szintjén befolyásoltuk, amit valósidejű PCR-al mérni is tudtunk. A CCL8 hatásának pontosabb megértéséhez a változás potenciális közvetítőjeként a miRNS-ek szerepe is felmerült. 800 vizsgált miRNS közül a dermális fibroblasztokban számos expressziója változott drámaian a kezelés hatására, s így lehetőség volt egy úgynevezett CCL8 hatás-specifikus mintázat létrehozására. Közülük az irodalmi adatok szerint is a CCL8 expresszióját szabályozó miR146a-nak a mennyiségi viszonyait vizsgáltuk meg a fentebb említett humán klinikai mintákon. Ezen miRNS-eknek az expressziójában szignifikáns különbséget igazoltunk humán metasztatikus/nem metasztatikus betegcsoportjaink között is. Mivel a miRNS-ek kimutatása egyszerűbb és kevésbé érzékeny a rutin szövetszövet eljárással szemben, a miR146a potenciális diagnosztikus/prognosztikus faktorként is szerepet játszhat a melanóma patológiájában.

A xenotranszplantációs modellrendszerben kevésbé szigorú feltételek mellett még további öt gén volt, melyek vizsgálatát klinikai mintákon megpróbáltuk validálni, azonban az említett gének a CTSL, DEAD BOX 60, FAM 168, PXMP és a LASS 5 a peremfeltételeken túl a klinikai minták vizsgálata során sem bizonyult metasztatizációsszociálnak, így a továbbiakban nem képezték vizsgálatunk tárgyait.

Érdekes jelenség, hogy a kísérletes állatmodellünk és a humán műtéti anyagokon végzett méréseink eredményei látszólag ellentmondanak egymásnak. Az *in vitro* kísérletes rendszer felépítése többek között azt is igyekszik megfejtetni (ami egyben súlyosan felveti az állatmodellek kritika nélküli alkalmazásának bírálatát is), hogy a humán műtéti mintákban mért eredmények miért térnek el ettől. Tény, hogy az állatmodellben a host eredetű expresszióra helyeztük a hangsúlyt, hisz eredendően az áttétképzés host eredetű faktorainak a vizsgálata volt a célunk. A tumor-host kölcsönhatás azonban kihagyhatatlan része az áttétképzésnek. Ezt igyekeznek bizonyítani a dolgozat *in vitro* kísérletei: a host eredetű faktorok CCL8 expresszióját gátolja a tumor eredetű CCL8, míg a fokozott host eredetű CCL8 termelés fokozott motilitást ad a tumorsejteknek. A két oldal közötti egyensúly (vagy annak eltolódása) lehet **egyik** komponense az áttétképzés folyamatának. Azaz mivel a klinikai mintákban mindkét oldal kumulált kimenetét mértük, ez a vektor már nem a host, hanem a host-tumor kölcsönhatás kimenetét jelzi és értelemszerűen nem is lehet egyenlőségjelet tenni a két vizsgálat között. Ritka szerencsének – ám kétségtelenül a biológiai rendszerektől távolabb esőnek – bizonyult volna, ha egyértelmű megfelelést igazolunk a két rendszer között. A kísérleti rendszerben egy tiszta helyzetet modelleztünk, ahol a host kemokinjeit nem expresszáló tumort implantáltunk, majd a host mint egyedüli ccl12 forrás mennyiségi változásait vizsgáltuk a metasztatizáláshoz kapcsolódóan. A humán mintáinkban immunhisztokémiai reakcióval igazoltuk, hogy a tumor környezete mellett a tumorsejtek kis csoportjai is expresszálják a ccl8-at, nem csak a host sejtek. Munkahipotézisünk szerint, az állatkísérletes modellünkben a host-tumor kölcsönható rendszer csak részben valósul meg. Azaz a tumor eredetű faktorok stimulálják a környezetükben elsősorban a dermális fibroblasztokban az egér CCL8 termelését. A kísérlet tanúsága szerint az el is látja kemoattraktáns funkcióját, azonban minden jel szerint az ellenkező irányban a hatás (feltehetőleg szerkezeti okokból) nem működik. Ezt már csak humán mintáinkon követhetjük

nyomon, ahol a környezetből származó CCL8 a tumorsejtek kemokintermelését is elindítja. *In vitro* kísérleteink szerint ez visszacsatoló rendszerként működik, hisz mint láttuk, külső CCL8 hatásra a fibroblasztok CCL8 expressziója leáll. Azaz, ha a primer tumorban felnő egy (tüdő) áttétképzésre hajlamos CCL8-at expresszáló populáció, az visszaszoríthatja a fibroblasztok CCL8 termelését így össztumor szintjén alacsonyabb relatív expressziós szintet mérhetünk. Jól beleillik ebbe a szabályozó körbe a miR146 expressziója, amely értelemszerűen visszaállítani igyekszik az eltolt egyensúlyt, azaz overexpresszált az áttétképző tumorokban. Ezzel szemben az áttétet nem képző tumorokban a fibroblasztok CCL8 expresszióját nem szorítja vissza semmi, magas relatív expressziójához alacsony miR146 expresszió társul.



A tumorsejtek és az őket körülvevő környezet közötti kommunikáció a sejtfelszíni molekulák közvetítésével történik. Ezek egyike a kollagén XVII amely a normál fiziológias megjelenésén túl osztódó melanómákban és így xenotranszplantált humán primer melanómákban is kimutattuk. Igazolni tudtuk, hogy a progresszió során a primer tumorból kiváló metasztatikus sejtek a távoli szervekben alapított elkülönülő áttétek szintén megtartották eme tulajdonságukat. A proteolitikus hasításon átesett molekulának a sejt funkciójában betöltött szerepét a viabilitást és letapadást befolyásoló, valamint apoptózist indukáló hatásán keresztül *in vitro* kísérletek során vizsgálatuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a kollagén XVII endodoménnel rendelkező melanóma sejtek célzott kollagén XVII kezelése a viabilitást csökkenti, s egyben az apoptotikus képességét növeli.

Szintén a tumorsejtek környezetéből közvetítenek jeleket a tumorsejt felé a CD44 sejtfelszíni molekulák, amelyek szerepe számos daganat, így többek között a humán melanómák áttétképzésében is meglehetősen ellentmondásosnak bizonyult. A jelenség hátterében igen nagy valószínűséggel az áll, hogy elsősorban daganatokban az egységes „CD44” néven definiált molekula valójában számos, egymástól szerkezetileg és funkcionálisan eltérő molekulát fed, amely a molekula alternatív splicingja révén keletkezik és akár egyszerre, egyidejűleg van jelen a tumorsejtek felszínén. A szerkesztési folyamat során a molekula variábilis exonjai közül meghatározott számú és kombinációjú messenger RNS molekula szerkesztődik össze, melynek fehérjeterméke egymástól eltérő funkcióval bír. Az irodalmi

adatok nem kezelik megfelelő súllyal azt a tényt, hogy a keletkezett fehérjék csak nevükben azonosak, funkcionálisan eltérőek lehetnek. Nehéz vizsgálhatósága miatt meglehetősen kevés eredmény számolt be az így keletkező molekuláris mintázatról, illetve ennek a molekuláris lenyomatnak tumortípusra jellemző sajátosságairól. Munkacsoportunk vizsgálatai igazolták, hogy a progresszió folyamán a primer tumor és az abból kiinduló távoli áttétek CD44 mintázata megőrzött maradt. Ezen mintázatot alkotó CD44 molekulák típusait azonosítottuk újgenerációs szekvenálással megalapozva annak a lehetőségét, hogy eltérő funkciójú variánsok korrekt azonosításával megtaláljuk az áttétképzéssel valóban összefüggésben lévő CD44 molekulaváltozatokat.

5. Az új megállapítások

- Humán melanóma xenograft állatmodell segítségével meghatároztuk a primer tumor strómális komponenseiben a tumorprogresszió során bekövetkező génexpressziós változásokat.
- A 20.000 vizsgált gén közül a 19 legnagyobb expressziós változást mutató gén validációját elvégezve több tekintetben a CCL12 kemokin ligandot találtuk legkiemelkedőbb progresszió-asszociált host eredetű faktornak.
- *In vitro* és *in vivo* vizsgálataink során jellemezve a CCL12 tumorprogresszióban betöltött szerepét az alábbi megállapításokat tettük:
 - A CCL12 humán homológjának a CCL8-nak, valamint receptorának a CCR1-nek az expresszióját nukleinsav és fehérje szinten is kimutattuk humán primer melanómákban
 - A CCL8 tumorsejtek viabilitására gyakorolt hatása nem jelentős, viszont kemoattraktánsként fokozza azok migrációját
 - Humán klinikai mintákban a tüdőáttétet adó primer melanómák CCL8 expresszió szintjén elkülöníthetőek voltak a nem metasztatikus mintáktól.
 - A progresszió különböző állomásait nukleinsav valamint protein szinten vizsgálva megállapítottuk, hogy a CCL8 keringő tumorsejtekben és a metasztázisokban egyaránt kimutatható
 - *In vitro* dermális fibroblasztokban a CCL8 csökkentette saját expresszióját
- Egy 800 miRNS-t tartalmazó panelt vizsgálva meghatároztuk, hogy közülük melyek azok, amelyek a CCL8 kezelés hatására szignifikáns változást mutatnak humán dermális fibroblasztokban. Humán klinikai mintákon igazoltuk, hogy a kiemelten kezelt miRNS-ek közül a miR146a eltérő mértékben van jelen a metasztatikus és nem metasztatikus humán primer melanómákban
- Kimutattuk, hogy melanóma xenograft állatmodellünkben a kollagén XVII expresszió a primer tumorban és a szervi metasztázisokban nem változik, valamint, hogy a kollagén XVII endodoménnel rendelkező melanóma sejtek célzott kollagén XVII kezelése azok viabilitást csökkentette ugyanakkor az apoptotikus képességét növelte
- Meghatároztuk a CD44 humán melanómákra jellemző alternatív splice-mintázatát és igazoltuk, hogy ez a mintázat a tumorprogresszió során kvalitatívan stabil marad, míg kvantitatívan egyértelműen változást mutat.

6. Publikációs lista

A dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények:

Barbai T, Fejős Z, Puskas LG, Tímár J, Rásó E. (2015) The importance of microenvironment: the role of CCL8 in metastasis formation of melanoma *Oncotarget*, 6(30):29111-28.

Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, **Barbai T**, Plotar V, Timar J, Raso E. (2012) Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol.*, 138(4):653-67.

Raso-Barnett L, Banky B, **Barbai T**, Becsagh P, Timar J, Raso E. (2013) Demonstration of a Melanoma-Specific CD44 Alternative Splicing Pattern That Remains Qualitatively Stable, but Shows Quantitative Changes during Tumour Progression. *PLoS One.*,8(1):e53883.

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Garay T, Molnár E, Juhász É, László V, **Barbai T**, Dobos J, Schelch K, Pirker C, Grusch M, Berger W, Tímár J, Hegedűs B. (2015) Sensitivity of Melanoma Cells to EGFR and FGFR Activation but Not Inhibition is Influenced by Oncogenic BRAF and NRAS Mutations. *Pathol Oncol Res.*, 21(4):957-68.

Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, **Barbai T**, Timar J, Kovalszky I, Cserepes M, Rozsas A, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. (2015) Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.*, 10(5):738-46.

Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, **Barbai T**, Timar J, Rozsas A, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. (2014) Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*, 50(10):1819-28.

Moldvay J, **Barbai T**, Bogos K, Piurko V, Fillinger J, Popper HH, Tímár (2013) EGFR autophosphorylation but not protein score correlates with histologic and molecular subtypes in lung adenocarcinoma *J. Diagn Mol Pathol.*, 22(4):204-9.

Rásó E, **Barbai T**, Györfly B, Tímár J. (2013) Prognostic and predictive markers of malignant melanoma. *Magy Onkol.*, 57(2):79-83

Madaras L, Baranyák Z, Kulka J, Szász AM, Kovács A, Lan PH, Székely B, Dank M, Nagy T, Kiss O, Harsányi L, **Barbai T**, Kenessey I, Tőkés AM. (2013) Retrospective analysis of clinicopathological characteristics and family history data of early-onset breast cancer: a single-institutional study of Hungarian patients. *Pathol Oncol Res.*, 19(4):723-9.

Bánky B, Rásó-Barnett L, **Barbai T**, Tímár J, Becságh P, Rásó E. (2012) Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Mol Cancer*, 14;11:83.

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorác A, Törzsök P, Kovalszky I, **Barbai T**, Rásó E, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. (2013) Molecular characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 19(1):63-70.

Hegedûs Z, **Barbai T**, Tátrai P, Hegedûs B, Kiss A, Rásó E, Bodoky G. (2011) Effect of KRAS mutation status on the efficiency of Avastin therapy of colorectal cancer. *Magy Onkol.*, 55(2):99-100.

Badalian G, **Barbai T**, Rásó E, Derecskei K, Szendrői M, Tímár J. (2007) Phenotype of bone metastases of non-small cell lung cancer: epidermal growth factor receptor expression and K-RAS mutational status. *Pathol Oncol Res.*, 13(2):99-104.