

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**PRIMER MALIGNUS MELANOMÁK
PROGRESSZIÓJÁNAK HÁTTERÉBEN ÁLLÓ
GENETIKAI ÉS EPIGENETIKAI ELTÉRÉSEK**

Ecsedi Szilvia Irina

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2014**

A doktori értekezés betétlapja

**PRIMER MALIGNUS MELANOMÁK
PROGRESSZIÓJÁNAK HÁTTERÉBEN ÁLLÓ
GENETIKAI ÉS EPIGENETIKAI ELTÉRÉSEK**

Értekezés a doktori (PHD) fokozat megszerzése érdekében
az *egészségtudományok* tudományágban

Írta: **Ecsedi Szilvia Irina** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Megelőző orvostan és népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

Dr. Tóvári József, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. július 10. 11. óra
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Puskás László, az MTA doktora

Dr. Balogh István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora

tagok: Dr. Puskás László, az MTA doktora

Dr. Balogh István, PhD

Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

Dr. Tóvári József, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. július 10. 13 óra
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

BEVEZETÉS

Az emelkedő incidenciájú és rendkívül agresszív humán malignus melanoma, más szolid daganatokhoz hasonlóan, akkumulálódó genetikai és epigenetikai eltérések által alakít ki olyan megváltozott génexpressziós mintázatot, mely lehetővé teszi a daganat gyors alkalmazkodását és túlélését a bőr hámrétegeiben, továbbá terjedését más szövetek felé. Saját eredményeink és irodalmi adatok alapján a melanomák progresszióját több száz gén funkcióvesztése jellemzi, melynek DNS szintű okait kutatva a mutációk és a kópiaszám-változások már régóta ismert jelenségek.

A genetikai eltéréseken kívül a daganatok kialakulásában és progressziójában igen fontos szerepet játszhatnak az epigenetikai változások, melyek közül a legjobban tanulmányozott és legstabilabb, öröklődő forma a DNS metiláció. A gének promoter régióin gyakori ún. CpG szigeteken előforduló hipermetiláció direkt módon akadályozhatja a génátírást, ezért jelenleg intenzív kutatások tárgya. A melanomák hipermetilációjának vizsgálata eddig azonban mindössze kandidáns gén megközelítéssel vagy olyan globális, de indirekt módszerekkel történt, melyek során elsőként vizsgálták a teljes genom génexpresszióját, majd egy agresszív demetilációs kezelést követően újra elemezték a génexpressziós mintázatot, ezzel közvetve azonosították az eredeti állapotban hipermetilált géneket. A genom nagyobb részét analizáló metilációs tanulmányok többsége a melanomák és a szomszédos normál szövetek vonatkozásában végez összehasonlító vizsgálatokat, így jelenleg nincs információnk arról, hogy a melanomák epigenetikai mintázata változik-e a daganat progressziójának különböző szakaszaiban. További kutatások tárgyát képezheti annak felderítése, hogy a gének

adott csoportjának megváltozott metilációs állapota milyen jelátviteli útvonalakat aktivál.

A lokalizált hipermetiláció mellett máig alábecsült az ún. genomszintű hipometiláció jelensége, melyet sokáig a karcinogenezis passzív következményeként írtak le, később azonban emlődaganatokban sikerült bizonyítani, hogy egy aktív és irányított folyamat, mely a tumorigenezis korai szakaszában is jelentkezhethet, ezért további vizsgálatokra érdemes kandidáns diagnosztikai markerként értelmezhetjük. A genomszintű hipometiláció – kialakulásának okától függetlenül – hozzájárul a valamennyi daganattípust jellemző genetikai instabilitáshoz az ún. ismétlődő szekvenciák demetilációja által. Ezek az ismétlődő szekvenciák olyan mozgékony genetikai elemek, melyek az evolúció során épültek a humán genomba, ahol a teljes genetikai anyag több mint 40%-át képviselik. A humán genomban metiláltságuk révén maradhatnak védve a génátíródástól, metilációjuk megszűnése egyúttal aktivációjukat is jelenti, mely erős homológiájukat tekintve rekombinációs események sorozatát indítja el, további deléciókat, és inszerciókat kialakítva jelentősen hozzájárul a kariotípusos instabilitáshoz.

Korábbi tanulmányaink során nagyfelbontású Affymetrix chip segítségével a melanómák mRNS expresszióját vizsgálva, a kedvezőtlen klinikai tulajdonságokkal társuló mintákban 1080 megváltozott expressziójú gént azonosítottunk, melyek túlnyomó többsége downregulálódott. Ez, a több száz gént érintő expressziós alulműködés bár az irodalomban is ismert jelenség, napjainkban a gének túlnyomó többségének downregulációjára továbbra sincs meggyőző magyarázat. A melanómákat tanulmányozó irodalomban jelenleg nem található egyetlen olyan tanulmány sem, mely különböző klinikai tulajdonságú primer melanómában integráltan vizsgálná a

megváltozott génexpresszióval összefüggő genetikai- és epigenetikai eltéréseket. Az integrált gondolkodásmód és vizsgálati módszerek könnyebben rávilágíthatnak azokra a molekuláris defektusokra, melyek valóban szerepet játszanak a melanomák agresszív biológiai viselkedésében. Ilyen módon új molekuláris célpontokat azonosíthatunk mind diagnosztikai mind terápiás célokra, mely a malignus melanoma esetében különösen sürgető, hiszen jelenleg a primer melanomák kezelése elsődlegesen sebészi, azonban a gyors és radikális beavatkozások ellenére a betegek többsége áttétképzés következtében meghal.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink céljait az alábbi csoportosításban foglaljuk össze:

Genomszintű hipometilációs vizsgálatok

- Vizsgáltuk a *LINE 1* transzpozon szekvencia 6 CpG pontjának demetilációját. Elemeztük a transzpozonális hipometiláció és a melanomás betegek 5 éves túlélése, továbbá a minták biológiai tulajdonságai közötti kapcsolatot.

Lokalizált metilációs mintázatok tanulmányozása

- Több mint 800, daganat progresszióban szerepet játszó gén DNS metilációs mintázatát tanulmányoztuk ún. bead esszé segítségével különböző biológiai tulajdonságú primer melanoma mintán.
- Vizsgáltuk, hogy milyen összefüggés van a DNS metilációs mintázata és a szomatikus DNS változások génkópiaszám-eltérések, gyakori mutációk) között.

Integrált génexpressziós és génkópiaszám vizsgálatok

- Célunk volt a nagyfelbontású array CGH-val kimutatott kópiaszám- és génexpressziós eltérések közötti kapcsolat analízise. A cisz-helyzetű génkópiaszám-eltérések hatásának vizsgálata mellett, célul tűztük ki annak elemzését, hogy az eltérések hatással vannak-e távolabbi gének expressziójára.
- Összehasonlítottuk a DNS metilációs vizsgálataink célgénjei és a korábbi génexpressziós tanulmányaink során detektált eltéréseket, tanulmányoztuk, hogy a DNS metiláció milyen hatással van a génexpresszióra.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

MELANOMA MINTÁK

Valamennyi melanoma szövet (n=46) a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájáról származott. A disszertációban ismertetett kutatás a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottságának jóváhagyásával történt a vonatkozó szabályozások figyelembevételével. A betegek beleegyező nyilatkozatával minden esetben rendelkezünk. A tumorok diagnosztizálása formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szöveti metszetek hematoxilin-eozin festését követően történt a Bőrgyógyászati Klinikán. A klasszifikáció során, a TNM besorolási rendszernek megfelelően a Breslow vastagságot, az ulcerációt és az áttétképzést vettük figyelembe. Emellett vizsgáltuk a szöveti altípust, továbbá a statisztikai elemzések során – az áttétképzéshez hasonlóan – 5 éves követési időt alkalmaztunk. Terápiás jelentősége miatt a klinikai adatokkal párhuzamosan a melanoma szövetek BRAF mutációs státuszát is meghatároztuk.

A friss vagy -80 °C-on, folyékony nitrogénben fagyasztott primer melanomákból genomi DNS (G-spin izoláló kit, Intron, Korea), és totál RNS-t (RNeasy Mini kit Qiagen GmbH, Németország) izoláltunk. A minták koncentrációját NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektro-fotométerrel határoztuk meg (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), a DNS preparátumok integritását 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel, míg az RNS minták minőségét Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, CA, USA) rendszerrel ellenőriztük.

LABORATÓRIUMI TECHNIKÁK

Na-biszulfit piroszekvenálás

A genom szintű hipometilációt 46 primer melanoma mintán tanulmányoztuk a humán genomban 10^4 kópiában szétszórta, 5-6 kb hosszúságú *LINE 1* (long interspersed nucleotide element 1) transzpozon szekvencia promotor régiójára tervezett, 6 CpG pontjára specifikus piroszekvenálással (PSQ 96MA, Biotage, Svédország). Az eredmények kvantitatív értékelését, Biotage cég Q-CpG szoftverének segítségével végeztük el. A piroszekvenálást megelőzően a genomi DNS mintákon Na-biszulfit kezeltük (EZ DNA Methylation-Gold kit, Zymo Research, CA, USA). Ez az eljárás a metilátlan citozinokat uracillá konvertálja, míg a metiláltakat változatlanul hagyja. Ez a különbség teszi lehetővé, hogy eredményeinket egynukleotidos C/T polimorfizmusként értelmezzük.

DNS metilációs bead esszé

Lokalizált DNS metilációs tanulmányainkat Illumina GoldenGate Cancer Panel I metilációs esszén végeztük (Illumina, CA, USA). Az eljáráshoz az előzetesen Na-biszulfittal kezelt DNS mintákból 42 primer melanoma DNS mintát használtunk. A módszer összesen 807 – irodalmi adatok alapján daganatokkal asszociálódó – gén, főként promotor régióra specifikus, összesen 1.505 CpG próbát tartalmaz 3 mm átmérőjű szilika gyöngyökhöz kötve. Elemzéseink során a metilációs értékek (Avg-beta) \log_2 értékeit, az ún. M-értékeket használtuk. Az irodalmi adatokkal egyezően a nemi kromoszómákra specifikus, továbbá a minták több mint 10 %-ában alacsony p-értéket ($p < 0.01$) adó CpG eredményeket kizártunk az analízisből. Eredményeinket BRB Array Tools szoftver segítségével analizáltuk.

Kvantitatív RT-PCR

DNS metilációs Bead esszé eredményeink alapján az *FGFR3*, *IL8* és *MCAM* géneket választottuk eredményeink génexpressziós szinten történő validálásához. A reakciókhoz TaqMan egy lépéses kvantitatív RT-PCR-t alkalmaztunk. Mintánként 3 párhuzamos elemzést végeztünk ABI-PRISM 7000 készüléken (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). A reverz-transzkriptázt, Master Mixet és génexpressziós esszéket a Life Technologies cégtől szereztük be. Az adatelemzést az ún. Livak módszerrel végeztük; belső kontrollként *GAPDH*-t, kalibrátorként pedig három egészséges donorból izolált benignus nevus mintát használtunk.

Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)

A vizsgálatokat fagyasztott tumorokból készített lenyomat preparátumokon hajtottuk végre. A négy régióra specifikus (6-os centroméra, 6p25-*RREB1*; 6q23-*MYB* és 11q13-*CCDN1*) DNS próba mixet (Abbott Molecular Inc., USA) és target sejteket egyszerre denaturáltuk, majd hibridizációs kamrában hibridizáltuk a protokollnak megfelelően. A kiértékelést konfokális mikroszkóppal (ZEISS LSM 710) végeztük, melynek során legalább 50 sejtet számoltunk meg az irodalomban leírt kritériumoknak megfelelően. A négy színű FISH-ről készült felvételeket digitális képanalizáló rendszerrel készítettük.

Array komparatív genom hibridizáció és integrált genom analízis

A komparatív genom hibridizációs (angol neve után CGH) vizsgálatokat a NimbleGen Központi Szolgáltató Laboratóriumában végezték (Reykjavik, Izland) a teljes humán genomot lefedő, HG18 CGH 4x72 Whole Genome Tiling v2.0 típusú mikroarray platformon 26 primer melanoma szövetből izolált

genomi DNS mintán. A fluoreszcencia intenzitás eredmények \log_2 értékeit a Nexus Copy Number 5.1 Discovery Edition szoftver segítségével elemeztük (BioDiscovery, CA, USA). A kópiaszám-eltéréseket ún. GISTIC algoritmus segítségével detektáltuk, melyet kifejezetten daganat minták elemzésére fejlesztettek ki. Az array CGH eredményeket integrált genom analízishez használtuk fel, melynek során megvizsgáltuk a genomi eltérések és a DNS metilációs változások közötti kapcsolatot (n=26 primer melanoma), továbbá részletesen elemeztük a cisz- és transz irányú gének kópiaszám-eltéréseket (ld. Statisztikai módszerek fejezet).

STATISZTIKAI MÓDSZEREK

Genom szintű DNS metilációs elemzések

LINE 1 piroszekvenálás eredményeink normál eloszlását „D’Agostino and Pearson omnibus normality” teszt segítségével ellenőriztük. Mivel a hat CpG pontra kapott metilációs értékek nem bizonyultak normális eloszlásúnak, továbbá transzformáció segítségével sem sikerült normalizálni adatainkat, ezért a továbbiakban nem-paraméteres statisztikai tesztek alkalmaztunk. „Receiver Operating Characteristic” (ROC) görbék segítségével állapítottuk meg azokat a határértékeket, melyek segítségével kialakítottuk az ún. hipometilált és nem-hipometilált mintacsoportokat a túlélési analízishez. A csoportokra Kaplan-Meier túlélési görbéket alkottunk, a túlélési esélyeket pedig Log-Rank teszttel és Cox regresszióval vizsgáltuk.

A genom szintű hipometilációs és a minták biológiai tulajdonsága közötti kapcsolatot logisztikus regressziós modell segítségével és Kruskal Wallis teszttel tanulmányoztuk; utóbbira Dunn’s féle poszt-tesztet végeztük az 5 éven belül kialakuló

áttétek száma alapján. Valamennyi elemzést GraphPad Prism 5.0 (CA, USA) és MedCalc (Ostend, Belgium) statisztikai szoftverekkel végeztünk, és a 0,05-nél kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Lokalizált DNS metilációs elemzések

Az Illumina GoldenGate Cancer Panel I metilációs esszé segítségével kapott eredményeinket BRB Array Tools szoftver segítségével elemeztük. A mintacsoportok közötti szignifikánsan eltérő metilációjú CpG pontokat FDR korrigált t-teszt segítségével (a háromkategóriás Breslow vastagság esetén f-tesztet használtunk) állapítottuk meg. A mintacsoportok közötti eltérések megerősítésére főkomponens analízist is végeztünk. Az egyes csoportok közötti átfedések megállapításához Venn-diagramokat használtunk. A metilált gének jelátviteli funkciójának tanulmányozásához Efron-Tibshirani tesztek végeztünk. Vizsgáltuk a DNS metilációs mintázat és a melanomás betegek 5 éves túlélésének kapcsolatát Kaplan-Meier görbék és Cox regresszió segítségével.

Integrált genom analízis

Array CGH eredményeink feldolgozását követően integrált génexpressziós és génkópiaszám elemzést végeztünk, melynek során szignifikáns kópiaszám-változásokat mutattunk ki, majd ezeket az eredményeket korábbi génexpressziós eredményeinkkel hasonlítottuk össze. Mivel néhány éve merült fel annak lehetősége, hogy a kópiaszám-eltérések nemcsak cisz-irányban befolyásolják a génexpressziót, hanem képesek transz-irányba hatva más gének kifejeződését is szabályozni, ezért a Yuan és mtsai. által kidolgozott ún. „LOL” (Lots of Lassos) algoritmust felhasználva R-programnyelvben saját mintáinkat is elemeztük.

EREDMÉNYEK

A GENOMSZINTŰ HIPOMETILÁCIÓ VIZSGÁLATA

Az evolúció során a humán genomba integrálódott retrovírus eredetű *LINE 1* transzpozon génexpressziós inaktivációja promoter régiójának nagyfokú metiláltsága révén biztosított. Vizsgálataink során a *LINE 1* promoter régióján található 6 CpG pont metilációját határoztuk meg Na-biszulfít piroszekvenálással. Eredményeink alapján valamennyi *LINE 1* transzpozonális CpG pont metilációs szintje alapján alkotott hipometilált és nem-hipometilált csoportok túlélési görbéi között szignifikáns különbséget mutattunk ki.

A Cox regressziós modell alkalmazásával azonban, a klinikai adatok figyelembe vételével ezek a veszélyhányadosok minden esetben lecsökkentek és eltűnt a szignifikáns különbség. A Cox regressziós analízis „stepwise” módszere a metasztázisok jelenlétére hívta fel a figyelmet, mint a túlélési különbségeket alakító fő paraméterre, melyet a logisztikus regressziós modell is megerősített. Analízisünket tovább bontottuk a kialakuló áttétek száma alapján: az egy vagy több áttétet képző minták szignifikáns demetilációját állapítottuk meg a nem metasztatizáló daganatokhoz képest.

A REGIONÁLIS DNS METILÁCIÓS MINTÁZATOK TANULMÁNYOZÁSA

A regionális vagy lokalizált DNS metilációs eredményeink értékelése során részletesen tanulmányoztuk az ismert klinikai paramétereket (Breslow vastagság, áttétképzés, ulceráció és szöveti altípus) jellemző metilációs mintázatot. Összesen 111 egyedi gént érintett az egyes csoportok között

eltérő metilációs mintázat. Eredményeink szerint, a progresszió folyamatát leginkább a metiláció csökkenése jellemzi, DNS hipermetilációra lényegesen kevesebb példát találtunk. Megállapítottuk, hogy az egyes klinikai paramétereket egyedi metilációs mintázat jellemzi.

Terápiás jelentősége miatt, részletesen vizsgáltuk a *BRAF*^{V600E} mutáció és a DNS metiláció kapcsolatát. A mutációval asszociálódó megváltozott metilációjú gének többsége hipermetilálódott, és a sejt-kommunikációban, továbbá az extracelluláris mátrix receptor interakcióban játszott szerepet, ugyanakkor kevés átfedést mutatott a négy klinikai paraméterrel összefüggő, összesen 111, metilát génnel (ld. fentebb). A jelenség így a mutáció egyedi vezérlő szerepét veti a fel a DNS metiláció szabályozásában.

Három kiválasztott génre (*FGFR3*, *IL8* és *MCAM*) megvizsgáltuk, hogy a DNS metilációs változások hogyan hatnak a génexpresszióra. Mindhárom génnél a két mechanizmus inverz kapcsolatát mutattuk ki, mely az *IL8* és az *MCAM* géneknél szignifikánsnak adódott, azaz a rossz prognózisú melanomák csoportjában magasabb génexpressziót találtunk.

Vizsgáltuk a DNS metiláció és a melanomás betegek 5 éves túlélése közötti kapcsolatot. A klinikai paraméterekre korrigálva egyetlen génnél, a *KIT* génnél láttunk példát arra, hogy a hipermetiláció csökkent túlélési eséllyel társul.

Promoter metilációs eredményeinket génkópiaszám adatainkkal integrálva, megállapítottuk, hogy a 6q23-as szakaszon lokalizálódó *MYB* és az *EYA4* géneknél a két különböző szomatikus DNS alteráció (deléción és DNS hipermetiláció) a „Knudson’s two hit” hipotézis értelmében együttesen alakítja ki a melanomák megváltozott génexpressziós

fenotípusát. A 6q23-as szakasz delécióit FISH vizsgálattal is megerősítettük.

A primer melanómákra jellemző legmarkánsabb génkópiaszám eltéréseket (*MYB* deléció és *RREB1* és *CCND1* amplifikáció) FISH technikával erősítettük meg.

Génkópiaszám vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a metilációs mintázatot fenntartó enzimet (*DNMT1*) kódoló gént tartalmazó 19p13.2-es szakasz a vastagabb daganatokban (Breslow vastagság > 4mm) delécióit szenved.

INTEGRÁLT GÉNEXPRESSZIÓS, GÉNKÓPIASZÁM ÉS DNS METILÁCIÓS VIZSGÁLAT

Korábbi, nagyfelbontású mikroarray tanulmányunk során detektált, rossz prognózissal társuló és megváltozott expressziójú gének túlnyomó többsége (n=987 gén) downreguláltnak bizonyult, ezért további vizsgálatainkat ezen génextpressziós jelenség lehetséges genetikai tényezőinek megállapítására terveztük. Nagyfelbontású Tiling Array CGH segítségével vizsgáltuk a minták DNS kópiaszám eltéréseit, hogy olyan genom szakaszokat, ún. genomi forrópontokat azonosítsunk, melyeken nemcsak szignifikáns kópiaszámbeli különbség látható a jó és rossz prognózisú minták között, hanem ugyanakkor szignifikáns korreláció mutatható ki a kópiaszám-és a génextpressziós eredmények között.

Munkánk során, a 6q kromoszómán 5 szakaszt (6q14.1-q14.2; 6q16.3-q21; 6q22.31-q22.32; 6q23.3; 6q24.2), a 10q kromoszómán egyetlen szakaszt (10q25.3) azonosítottunk, melyeken az ulcerációra jellemző, statisztikailag szignifikáns deléció korrelált a génextpressziós eredményekkel. Ezekre a szakaszokra összesen 36 gén lokalizálódik, melyek közül vizsgálataink során 10 gén (*ELOV24*, *ME1*, *TPBG*, *AIM1*,

TPD52L1, *IL20RA*, *HEPB2*, *PERP*, *UTRN*, *ADLIM1*) downregulációját azonosítottuk. A felsorolt gének eltérő biológiai funkciói közül kiemelendő, hogy a *TPBG*, *PERP*, *URTN* és az *ADLIM1* a sejt-sejt kontaktusban és a sejt-mátrix adhézióban vesz részt, továbbá a *PERP* a p53 molekula által indukált apoptózis effektor. A *TPD52L1* szintén az apoptotikus nukleáris fragmentációban vesz részt. Irodalmi adatok szerint az *IL20RA* szövet specifikus interleukin receptorként a normál bőrben nagymértékben termelődik.

Elsőként állapítottuk meg, hogy a 6q27, 7q11 és 9p21 szakaszok delécióinak transz-irányú hatása is van, azaz más DNS szekvenciákon elhelyezkedő gének expresszióját is képesek befolyásolni, hasonlóan, mint a 6p25.3-p25.2, 17q22 és 17q24.3 régiók amplifikációja, melyek számos transz-irányban kódolt gén eltérő expresszióját okozzák.

Génexpressziós és DNS metilációs eredményeink összehasonlítása során 45 olyan gént találtunk, melyekre a gének promoter metilációs profilját is meghatároztuk, így a két módszer adatait integrált analízissel elemeztük. Tizenegy promoternél (*CDH13*, *DST*, *EPHB3*, *EPHB6*, *ETS2*, *FGFR2*, *FGFR3*, *ITGA2*, *JAG1*, *PTGS1*, *TIAMI*) a génexpresszió és a promoter metiláció inverz korrelációját detektáltuk, mely a transzkripciós inaktivitás lehetséges epigenetikai okára utal.

DISZKUSSZIÓ

Vizsgálataink során a rendkívül agresszív biológiai tulajdonságú, gyorsan metasztatizáló malignus elváltozás, a melanoma átfogó genetikai és epigenetikai analízisét végeztük.

Az epigenetikai vizsgálataink célja a két eltérő típusú DNS metilációs mechanizmus tanulmányozása volt. Elemeztük a *LINE 1*, aktív transzpozícióra képes retrovirális eredetű szekvenia promoter régiójában található 6 CpG pont metilációját. Eredményeink szerint az 5 éven belül áttétet képző melanomákat markáns transzpozonális demetiláció jellemezi. Ez a jelenség képezheti a jövőben egy *LINE 1* transzpozon metilációt célzó diagnosztikai vagy predikciós teszt kidolgozását.

A transzpozonális, más szóval genomszintű DNS metiláció tanulmányozása mellett, a jól reprodukálható Illumina bead esszé rendszer segítségével primer melanomák (n=42) daganatokkal asszociálódó gén (805 gén) – elsősorban promoter régióinak – DNS metilációs változásait vizsgáltuk. Célunk volt, annak megállapítása, hogy milyen DNS metilációs eltérések jellemzik a primer melanomák eltérő progressziós kategóriáit.

Számos új, az irodalomban eddig nem említett génnél detektáltunk DNS metilációs eltérést a melanomák biológiai tulajdonságaival összefüggően, azonban a progresszió előrehaladásával, sokkal jellemzőbbek bizonyult a promoter régiókon bekövetkező hipometiláció – az irodalomban lényegesen jobban hangsúlyozott – hipermetilációval szemben. Érdekes módon, a *BRAF*^{V600E} mutációval összefüggésben számos hipermetilált gént találtunk. Bár hasonló jelenséget már leírtak vastagbél daganatokban is, a jelenség oka eddig ismeretlen, ugyanakkor a *BRAF*^{V600E} mutáció DNS metilációban

betöltött vezérlő szerepét veti fel, melynek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

A klinikai paraméterekre korrigálva egyetlen génnél, a *KIT* génnél találtunk kapcsolatot a metilációs változások és a betegek csökkent 5 éves túlélési esélyei között. Mivel az általunk talált jelenség hipermetiláció, a *KIT* gén pedig tirozin-kináz aktivitással rendelkező onkogén, melyet napjaink egyik reménykeltő célzott terápiás lehetősége, az imatinib céloz meg, ezért eredményünket nem könnyű értelmezni. Elképzelhető, hogy az ellentmondásos jelenség hátterében egy másik epigenetikai jelenség áll: egy 2009-ben újra felfedezett mechanizmus, az ún. 6. bázis, az 5-hidroxi-metil-citozin (5-hm-C) az 5-metilcitozinnal (5-m-C) ellentétesen hatva gének aktivációját okozhatja. Bár pontos hatásmechanizmusa és szabályozása napjainkban intenzíven kutatott, az új bázis jelenléte 2012-ben már melanomákban is bizonyítást nyert. Mivel a 2-3 éve alkalmazott metilációs detektáló módszerek még nem tettek különbséget a 2 eltérő típusú metiláció között, ezért előfordulhat, hogy valójában a *KIT* gén hidroximetilációját mutattuk ki, mely a gén túlműködését okozhatja. Az új típusú metiláció, az 5-hm-C esetleges jelenléte, saját eredményeink – csakúgy, mint az összes hasonló 2012 előtt végzett metilációs tanulmány – részleges limitációját jelzi. A jövőben mindenképpen szükséges egy arra alkalmas módszerrel a *KIT* gén 5-hm-C mennyiségének ellenőrzése, és a túlélési statisztika ismétlése.

Vizsgálataink során a teljes genomot átfogó array CGH -el nyert adatok felhasználásával integrált genom analízist végeztünk. Tanulmányoztuk a DNS metiláció kapcsolatát a kópiaszám-eltérésekkel. Eredményeink alapján meglehetősen ritka a két mechanizmus együttes jelenléte, a melanoma

genomban mindössze a 6q23-as régió azonosítottuk a DNS hipermetiláció és a deléció összehangolt eltéréseit.

Az array CGH elemzések során a 19p12.3 régió delécióját azonosítottuk. A genomi lókusztérdeklődése, hogy a fenntartó metiltranszferáz gént kódolja (*DNMT1*). Ez az a molekula, mely elsősorban biztosítja hemimetilát DNS metilációs mintázatának tovább örökítését a DNS replikációk során. Figyelemre méltó, hogy ez említett deléciót kizárólag a vastagabb, előrehaladott stádiumú daganatokban mutattuk ki, mely felveti annak lehetőségét, hogy mind a transzpozon szekvenciákon, mind a promóter régiókon tapasztalt demetilációs tendencia ennek a deléciónak a következménye. Munkacsoportunk a jelenség igazolására jelenleg funkcionális vizsgálatokat végez.

Az integrált genom analízis során kerestük továbbá azokat a kópiaszám-eltéréseket, melyek kapcsolatba hozhatók a munkacsoportunk korábbi vizsgálataival során detektált génexpressziós eltérésekkel. Két olyan genomi forráspontot azonosítottunk a 6q és a 10q régiókon, melyeken az mRNS szinten detektált funkcióvesztés oka genomi deléció lehet. Az itt lokalizálódó gének többsége a sejt-sejt kontaktusban és a sejt-mátrix adhézióban, továbbá a p53 indukált apoptózisban vesz részt.

A cisz-irányú kópiaszám-eltérések mellett, az irodalomban egyedülállóan, olyan genom szakaszokat is detektáltunk, melyeken bekövetkező amplifikációk vagy deléciók távoli gének expresszióját befolyásolhatják.

FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS EREDMÉNYEK

A doktori disszertáció egyik fő célja volt, hogy átfogó képet kapjunk a primer malignus melanoma agresszív biológiai viselkedésével összefüggő genetikai és epigenetikai változásokról.

Genom szintű (transzpozonális) DNS metilációs analízis:

- Eredményeink szerint a *LINE 1* transzpozon szekvencia hipometilációja kapcsolatba hozható a primer melanomák áttétképző képességével.

Regionális (lokalizált) DNS metilációs vizsgálatok:

- A *BRAF*^{V600E} mutációt hordozó mintákat, továbbá a korai stádiumú melanomákat egyedi hipermetilációs mintázat jellemzi, mely csökken a daganat progressziója során.
- Lokális, összehangolt génkópiaszám csökkenést és DNS hipermetilációt figyeltünk meg a *MYB1* és *EYA4* géneket kódoló 6q22-q23 kromoszóma szakaszon.
- A *DNMT1* gént (fenntartó metiltranszferáz, mely a kialakult metilációs mintázat örökítéséért felel a DNS replikáció során) kódoló szakasz gyakran szenved deléciót a 4 mm-nél vastagabb daganatokban.
- Megállapítottuk, hogy a *KIT* gén hipermetilációja a melanomás betegek csökkent 5 éves túlélésével társul.

Integrált genom analízis:

- A kifekélyesedő felszínű melanomákban számos kópiaszám csökkenést detektáltunk a 6q és 10q kromoszóma szakaszokon. A gének többsége a sejt-sejt, sejt-mátrix és az apoptózisban résztvevő fehérjéket kódolnak.

- Elsőként mutattunk ki a melanoma genomban transz-irányba ható kópiaszám-változásokat.
- Megfigyeltük a génexpresszió és DNS metiláció inverz korrelációját, mely jelenség az epigenetikai mechanizmusok transzkripciós szabályozását erősíti melanoma progresszió során.

Eddigi eredményeink alapján mind a genom szintű, mind a regionális metilációs változások hozzájárulnak a melanoma progressziójához. Kimutattuk, hogy a DNS metilációs változások a kópiaszám-eltérésekkel együttműködve járulnak hozzá a daganat megváltozott fenotípusához. Integrált genom analízis segítségével ún. genomi forrópontokat azonosítottunk, valamint a kópiaszám-változások hatását távolabbi génekre is kimutattuk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Ádány Róza intézetvezető egyetemi tanárnak, hogy tanulmányaimat a Megelőző Orvostani Intézetben lehetővé tette. Külön köszönetet mondok, hogy lehetőséget adott számomra a Japánban folytatott tanulmányútra, ahol Tsuyoshi Takami Professzor irányításával számos új módszert tanulhattam.

Köszönetet mondok Dr. Balázs Margit tanszékvezető egyetemi tanárnak mindazért a támogatásért és bölcsességért, mellyel diákköri, majd doktori tanulmányaimat 2004 óta irányította.

Hálás vagyok Zdenko Herceg Professzornak, hogy franciaországi laboratóriumában, a Nemzetközi Rákkutató Intézetben tölthettem 3 hónapot, továbbá a labor valamennyi munkatársának köszönöm a munkám során nyújtott segítséget.

Köszönöm valamennyi jelenlegi és korábbi munkatársamnak támogatásukat és barátságukat.



Iktatószám: DEENKÉTK/85/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Ecsedi Szilvia

Neptun kód: ZWZDQM

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

Mmt azonosító: 10020957

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

1. **Ecsedi, S.I.**, Hernandez-Vargas, H., Lima, S.C., Vízkeleti, L., Tóth, R., Lázár, V., Koroknai, V., Kiss, T., Emri, G., Herceg, Z., Ádány, R., Balázs, M.: DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour.
PLoS One. "accepted by publisher", 2014.
IF:3.73 (2012)
2. **Ecsedi, S.I.**, Hernandez-Vargas, H., Lima, S.C., Herceg, Z., Ádány, R., Balázs, M.: Transposable hypomethylation is associated with metastatic capacity of primary melanomas.
Int. J. Clin. Exp. Pathol. 6 (12), 2343-2348, 2013.
IF:2.242 (2012)
3. Rákósy, Z., **Ecsedi, S.**, Tóth, R., Vízkeleti, L., Hernandez-Vargas, H., Lázár, V., Emri, G., Szatmári, I., Herceg, Z., Ádány, R., Balázs, M.: Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration.
PLoS One. 8 (1), e54958, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054958>
IF:3.73 (2012)
4. Balázs, M., **Ecsedi, S.**, Vízkeleti, L., Bégány, Á.: Genomics of human malignant melanoma.
In: Breakthroughs in Melanoma Research. Ed.: Yohei Tanaka, InTech, Rijeka, 237-263, 2011.





További Közlemények

5. **Ecsedi, S.**, Tóth, L., Balázs, M.: Array CGH analysis of the rare laryngeal basaloid squamous cell carcinoma: A case report.
Int. J. Clin. Exp. Pathol. 5 (8), 834-839, 2012.
IF:2.242
6. Lázár, V., **Ecsedi, S.**, Vízkeleti, L., Rákósy, Z., Boross, G., Szappanos, B., Bégány, Á., Emri, G., Ádány, R., Balázs, M.: Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization.
Melanoma Res. 22 (3), 202-214, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e328352dbc8>
IF:2.518
7. Vízkeleti, L., **Ecsedi, S.**, Rákósy, Z., Bégány, Á., Emri, G., Tóth, R., Orosz, A., Szöllösi, A., Méhes, G., Ádány, R., Balázs, M.: Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma.
Front Biosci (Elite Ed), E4 (1), 1802-1812, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2741/501>
8. Vízkeleti, L., **Ecsedi, S.**, Rákósy, Z., Orosz, A., Lázár, V., Emri, G., Koroknai, V., Kiss, T., Ádány, R., Balázs, M.: The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma.
Tumor Biol. 33 (6), 2189-2199, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0480-6>
IF:2.518
9. Juhász, A., Sziklai, I., Rákósy, Z., **Ecsedi, S.**, Ádány, R., Balázs, M.: Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9 correlates with the bone destruction capacity of cholesteatomas.
Otol. Neurotol. 30 (4), 559-565, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e31819fe6ed>
IF:1.435





10. Lázár, V., **Ecsedi, S.**, Szöllösi, A., Tóth, R., Vízkeleti, L., Rákósy, Z., Bégány, Á., Ádány, R., Balázs, M.: Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma.
Mod. Pathol. 22 (10), 1367-1378, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2009.109>
IF:4.406
11. **Ecsedi, S.**, Rákósy, Z., Vízkeleti, L., Juhász, A., Sziklai, I., Ádány, R., Balázs, M.: Chromosomal imbalances are associated with increased proliferation and might contribute to bone destruction in cholesteatoma.
Otolaryngol. Head Neck Surg. 139 (5), 635-640, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2008.07.019>
IF:1.409
12. Rákósy, Z., Vízkeleti, L., **Ecsedi, S.**, Bégány, Á., Emri, G., Ádány, R., Balázs, M.: Characterization of the 9p21 copy number alterations in human melanoma by fluorescence in situ hybridization.
Cancer Genet. Cytogenet. 182 (2), 116-121, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.01.008>
IF:1.482
13. Rákósy, Z., Vízkeleti, L., **Ecsedi, S.**, Vokó, Z., Bégány, Á., Barok, M., Krekk, Z., Gallai, M., Szentirmay, Z., Ádány, R., Balázs, M.: EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis.
Int. J. Cancer. 121 (8), 1729-1737, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22928>
IF:4.555

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30.267

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9.702

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.04.22

A értekezéshez kapcsolódó nemzetközi konferencia részvételek

Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Lima SC, Vizkeleti L, Toth R, Lazar V, Herceg Z, Adany R, Balazs M. Global hypomethylation and promoter related demethylation are associated with copy number loss of DNMT1 gene and unfavourable clinical outcome in primary melanomas. 38th FEBS Congress, 6-11 July, 2013, Szentpétervár, Oroszország

Ecsedi S, Lazar V, Vizkeleti L, Emri G, Rakosy Z, Adany R, Balazs M. Copy number variation and promoter methylation contribute to transcriptomic profiles associated with malignant melanoma progression. The 4th EMBO Meeting, 22-25 Sept, 2012, Nizza, Franciaország

Ecsedi S, Vizkeleti L, Lima SC, Hernandez-Vargas H, Rakosy Z, Herceg Z, Adany R, Balazs M. DNA methylation pattern of malignant melanoma at wide panel of cancer related genes. The 2nd EMBO Meeting, 4-7 Sept, 2010, Barcelona, Spanyolország

A értekezéshez kapcsolódó hazai konferencia részvételek

Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Herceg Z, Adany R, Balazs M. A daganat genom alterációi: epigenetikai és strukturális változások. VII. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 4-6 Sept, 2013, Kaposvár

Ecsedi S, Vizkeleti L, Hernandez-Vargas H, Lima SC, Toth R, Lazar V, Herceg Z, Adany R, Balazs M. Transposonal hypomethylation and local demethylation of primary melanomas are associated with copy number loss of DNMT1 and unfavourable clinical outcome. Hungarian Molecular Life Sciences 2013 Conference. 5-7 Apr, 2013, Siófok

Ecsedi S, Vizkeleti L, Lima SC, Hernandez-Vargas H, Herceg Z, Adany R, Balazs M. Hypo- és hypermetilációs epigenetikai mintázatok humán malignus melanomákban. VI. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 5-7 Sept, 2012, Budapest

Ecsedi S, Lima SC, Hernandez-Vargas H, Lazar V, Vizkeleti L, Rakosy Zs, Herceg Z, Adany R, Balazs M. Kópiaszám variabilitás és epigenetika

változások primer melanomákban. V. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 31 Aug - 2 Sept, 2011, Szeged

További konferencia részvételek

Ecsedi S, Vizkeleti L, Kiss T, Koroknai V, Rakosy Z, Emri G, Begany A, Adany R, Balazs M. Alterations of osteopontin protein (SPP1) expression in malignant melanoma. VIII. Hungarian Genetics Congress and XV. Cell and Developmental Biology Conference, 17-19 Apr, 2009, Nyíregyháza

Ecsedi S, Vizkeleti L, Rakosy Z, Juhasz A, Adany R, Balazs M. Cytogenetically analysis of cholesteatomas with different biological behaviour. V. Hungarian Cell Analytical Conference; 4-6 May, 2006, Budapest

Ecsedi S, Vizkeleti L, Rakosy Z, Juhasz A, Adány R, Balazs M. Analysis of chromosomal alterations in interphase cells in cholesteatomas. Hungarian Cancer Society XXVI. Congress 10-12 Nov, 2005; Budapest

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Emri G, Kiss T, Koroknai V, Adany R, Balazs M. Combined gene copy number and gene expression profiling of matched primary and metastatic melanomas. The 5th EMBO Meeting, 21-24 Sept, 2013, Amszterdam, Hollandia

Kiss T, Koroknai V, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Adany R, Balazs M. Osteopontin expression in malignant melanoma. VII. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 4-6 Sept, 2013, Kaposvár

Szasz I, Koroknai V, Kiss T, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Adany R, Balazs M. Genetic and gene expression changes are associated with drug resistance in melanoma cell lines. VII. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 4-6 Sept, 2013, Kaposvár

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Adany R, Balazs M. Combined gene copy number and gene expression profiling of matched primary and metastatic melanomas. Hungarian Molecular Life Sciences 2013 conference. 5-7 Apr, 2013, Siófok

Kiss T, Koroknai V, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Emri G, Adany R, Balazs M. The role of osteopontin expression in melanoma progression. Hungarian Molecular Life Sciences 2013 conference. 5-7 Apr, 2013, Siófok

Koroknai V, Kiss T, Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Szasz I, Adany R, Balazs M. Investigation of molecular alterations associated with the invasion of melanoma cell lines. Hungarian Molecular Life Sciences 2013 conference. 5-7 Apr, 2013, Siófok

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Orosz A, Lazar V, Emri G, Koroknai V, Kiss T, Adany R, Balazs M. CCND1 as a potential prognostic marker of cutaneous melanomas? CYTO 2012, XXVII Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, 23-27 June, 2012, Lipcse, Németország

Balazs M, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Lazar V, Emri G, Adany R. A melanoma genom eltérései. (NKE), 5-7 Sept, 2012, Budapest

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Emri G, Toth R, Koroknai V, Kiss T, Adany R, Balazs M. Genetikai eltérések szerepe humán melanomák progressziójában. VI. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 5-7 Sept, 2012, Budapest

Koroknai V, Kiss T, Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Adany R, Balazs M. Investigation of molecular alterations associated with melanoma invasion. VI. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 5-7 Sept, 2012, Budapest

Kiss T, Koroknai V, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Emri G, Adany R, Balazs M. The role of osteopontin in melanoma progression. VI. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 5-7 Sept, 2012, Budapest

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Orosz A, Lazar V, Rakosy Zs, Koroknai V, Kiss T, Emri G, Adany R, Balazs M. Ciklin D1 szerepe malignus melanomák progressziójában. V. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 31 Aug - 2 Sept, 2011, Szeged

Kiss T, Koroknai V, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Mehes G, Nagy B, Begany A, Emri G, Adany R, Balazs M. Osteopontin: a candidate molecule for melanoma progression. V. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 31 Aug - 2 Sept, 2011, Szeged

Koroknai V, Kiss T, Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Emri G, Balazs M, Adany R. The role of simultaneous genetic alterations in the progression of malignant melanoma. V. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 31 Aug - 2 Sept, 2011, Szeged

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Begany A, Emri G, Adany R, Balazs M. Genetic and gene expression alterations of the 7q31 locus in human melanomas. IV. Conference of the Hungarian Association of Public Health Schools (NKE), 2-4 Sept, 2010, Szombathely

Balazs M, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Lazar V, Rakosy Z, Begany A, Emri G, Adany R. Heterogeneity of the melanoma genome, the role of gene amplifications in tumor progression. Hungarian Cancer Society XXVIII. Congress, 12-14 Nov, 2009, Budapest

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Szollosi A, Emri G, Begany A, Mehes G, Adany R, Balazs M. Expression alterations of genes located on the 7q31 region in human malignant melanomas. ECCO 15 - 34th ESMO Multidisciplinary Congress, 20-24 Sept, 2009, Berlin, Németország

Balazs M, **Ecsedi S**, Vizkeleti L, Lazar V, Rakosy Z, Begany A, Emri G, Adany R. Diversity of the human melanoma genom. VIII. Hungarian Genetics Congress and XV. Cell and Developmental Biology Conference, 17-19 Apr, 2009, Nyíregyháza

Lazar V, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Toth R, Szollosi A, Emri G, Adany R, Balazs M. of Cyclin D1 and other candidate gene amplification in the 11q13 region in human primary cutaneous melanoma. ISAC XXIV. International Congress. Cytometry in the Age of Systems Biology, 17-21 May, 2008, Budapest

Vizkeleti L, Szollosi A, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Begany A, Adany R, Balazs M. Altered gene expressions on FRA7G fragile site in human malignant

melanoma. ISAC XXIV. International Congress. Cytometry in the Age of Systems Biology, 17-21 May, 2008, Budapest

Rakosy Z, Begany A, Emri G, Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Adany R, Balazs M. Role of EGFR gene amplification in melanoma progression. 80. Conference of Hungarian Society of Dermatology, 13-15 Dec, 2007, Budapest

Vizkeleti L, Lazar V, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Begany A, Adany R, Balazs M. Array Comparative Genomic hybridization Analysis of Cutaneous Melanoma; Marie Curie - Genome Architecture in Relation to Disease. Array techniques to identify copy number variations. Workshop 1, 11 – 15 Sept, 2007, Helsinki, Finnország

Balazs M, Lazar V, Rakosy Z, Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Begany A, Emri G, Adany R. Array CGH and fluorescence in situ hybridization analyses reveal new genomic alterations in malignant melanoma. MAF10 10th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, 9-12 Sept, 2007, Salzburg, Ausztria

Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Rakosy Z, Begany A, Adany R, Balazs M. Alterations of 7q31 locus in human malignant melanomas; V. Hungarian Cell Analytical Conference. 4-6 May, 2006, Budapest

Rakosy Z, Vizkeleti L, **Ecsedi S**, Begany A, Adany R, Balazs M. Analysis of gene expression pattern of primary malignant melanomas using microarray technique. V. Hungarian Cell Analytical Conference; 4-6 May, 2006, Budapest