

A bőrből kiinduló melanoma malignum irányító onkogén mutációi és szerepük tumorprogresszió során

Doktori értekezés

Dr. Doma Viktória

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tímár József, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Holló Péter, PhD, egyetemi tanár

Dr. Horváth Zsolt, PhD, központvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Marschalkó Márta, PhD, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pápai Zsuzsanna PhD, egyetemi tanár

Dr. Patócs Attila, DSc., egyetemi docens

Budapest
2020

Bevezetés

Történelemünk során a leggyakoribb halálok a fertőző megbetegedés volt egészen a 20. századig, amikor is az életszínvonal javulásával a krónikus betegségek vették át a vezető halálteki szerepet. A Föld lakosaira vonatkozóan a szív-, és érrendszeri megbetegedések, daganatos betegségek, légúti megbetegedések és a cukorbetegség felel a halálozások 70%-ért az urbanizációnak, globalizációnak, egészségtelen életmódnak és a lakosság elöregedésének köszönhetően. A daganatos megbetegedés a második leggyakoribb halálok közé tartozik világszerte, mely közül legnagyobb számban a bőrdaganatok fordulnak elő, bár a daganatos halálozást nem ez a betegségcsoport vezeti.

A sztratoszféra ózon rétege alapvető védelmi szerepet tölt be a Földön előforduló valamennyi élőlényre káros ultraviola sugárzással szembeni védelemben. Az UV B sugárzás elektromágneses spektruma 290-320 nm közé esik, ez a hullámhossz tartomány vonható leginkább felelősségre a napégésért és barnulásáért, valamint a sejtek DNS állományának károsításáért: az erőteljes UV sugárzás a genetikai állományban mutációkat okoz, amelyek daganatképződéshez vezethetnek.

A melanoma malignum viszonylag ritka daganatos megbetegedés, ugyanakkor a legmagasabb halálozási aránnyal bírók közé tartozik, valamint az előfordulási gyakorisága folyamatosan növekszik. Viselkedése nehezen megjósolható, még igen vékony, csupán néhány tized milliméteres tumorvastagság esetén sem elhanyagolható a távoli áttétképzés esélye, ezért a legagresszívebb daganatok közé sorolható. Statisztikai adatok alapján a 65-74 éves korosztályban a legnagyobb a melanoma okozta halálozás előfordulási valószínűsége az Amerikai Egyesült Államokban. Figyelemre méltó továbbá a betegséggel kapcsolatban, hogy regresszióra képes, vagyis az elsődleges daganat látszólag eltűnik a kültakaróról, azonban ez nem szab gátat az áttétképződésnek, ami végül a beteg halálához vezethet. További érdekessége, hogy az áttétképződés akár 5 év után, sőt, évtizedek múlva is bekövetkezhet. Leggyakoribb formája a bőrt érinti, de az elsődleges daganat kiindulásának akár a szem érhártyája (uvea), vagy a lágycyphártya (leptomeningeum) is otthont adhat, melynek magyarázata a melanoma keletkezésében kulcsszerepet játszó pigment sejtek (melanocita) fejlődésbiológiában rejlik. Az egyre szélesedő gyógyszeres kezelési lehetőségek ellenére a melanoma továbbra is komoly kihívást jelent az onkológusok számára az eltérő etiológiai faktorok (UV-indukálta, nem UV-indukálta), különböző biológiai viselkedés (érhártya melanoma vs. bőr melanoma), más-más genetikai eltérés (BRAF, NRAS, KIT, GNAQ gének) és a sokszor nehezen kiszámítható végkimenetel miatt.

Sajnálatosan a hazai halálozási adatok az európai daganatos halálozások élén állnak és bizonyos becslések szerint 2030-ra a 20-39 éves korosztályban a melanoma előfordulási

gyakorisága meg fogja közelíteni a vastagbél daganatok számát, ami manapság a második leggyakoribb daganat típus mindkét nemben.

Csírasejteket érintő mutációk már a megtermékenyített petesejtben - ezáltal a szervezet valamennyi sejtjében - jelen vannak, azonban a daganatos megbetegedésekért a sejtosztódás későbbi szakaszában keletkező mutációk felelősek, melyek csupán 1-1 szervrendszert érintenek. Általánosságban igaz, hogy a daganatos megbetegedések szórványosan jelentkeznek és a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó fontos fehérjéket kódoló génekben keletkezett mutációk felhalmozódásával hozhatók összefüggésbe, úgy mint a sejtosztódás és differenciálódás, valamint a programozott sejthalálért felelős gének (onkogének) funkció nyeresen alapuló mutációjával, illetőleg a sejthalálért felelős gének (tumorszuppresszor gének) funkció vesztésen alapuló mutációjával. A normál sejtek osztódása számtalanszor végbemegy, melybe olykor hibák csúsznak be, ezen hibák megjelenésének valószínűségét fokozzák bizonyos negatív környezeti tényezők. A legtöbb sejtosztódási hiba végül kijavításra kerül, azonban néhányuk kijavítása elmaradhat, ezek mutációk formájában fixálódnak.

Onkogéneknek nevezzük azokat a normális sejt működésért (osztódás, differenciálódás, sejthalál) felelős géneket, melyek irányító (driver) mutációt hordoznak. Az egyes betegekben (személyre szabott orvoslás) az ezen génekben fellelhető mutációkat célzó új gyógyszeres kezelések (célzott terápia) drámai módon változtatták meg az onkológiai betegellátást. Az első ilyen szer a CML-ben alkalmazott imatinib volt, ami egy szájon át szedhető tirozin-kináz gátló, ma már GIST-es és melanomás betegek is profitálhatnak ezen innovatív szer jótékony hatásából, mivel a KIT gén mutációját kimutatták ezekben a daganatokban, még ha melanoma esetén csupán csak a 3. leggyakrabban előforduló onkogén is a KIT. A bőr melanomájának esetében a leggyakrabban előforduló onkogén a BRAF, az esetek kb. 50%-ban találtak mutációt ebben a MAPK jelátviteli útvonalban szereplő génben, 99%-ban a 15. exon 600 -as kodonjában (V660E). Ennek a pontmutációnak egyik szelektív gátlószere a vemurafenib. További 15-20%-ban írtak le egy szintén MAPK jelátviteli útvonalhoz tartozó génben mutációt, ez pedig az NRAS. Habár a RAS géncsalád valamely tagjának mutációja az emberi daganatok mintegy harmadában előfordul, szelektíven ható RAS gátlószert nem sikerült a mai napig előállítani.

Daganatos halálozás leggyakrabban a létfontosságú szerveket érintő áttétképzés miatt következik be, mégis kevés a tudásunk az áttétképződés biológiájáról, annak molekuláris hátteréről. Doktori értekezésemben a bőr elsődleges és áttéti melanomájának irányító mutációit kerestem (KIT epidemiológia Közép-Európában), BRAF/NRAS mutáns allélok előfordulásának gyakoriságát (MAF), vagyis klonális heterogenitását vizsgáltam.

Célkitűzés

KIT és más melanoma onkogének előfordulási gyakoriságának meghatározása Magyarországon

A kültakaró melanomájának 3. leggyakoribb onkogénje a KIT. Azonban a krónikus napfénynek kitett bőrterületekről kiinduló melanoma (lentigo maligna melanoma, LMM) KIT mutációs rátája magasabb, illetőleg érdekes módon pont a nem-UV indukálta melanomák közé tartozó, a végtagok disztális részéről kiinduló melanomáké (acrolentiginous melanoma, ALM), valamint a nem-bőr, hanem egyéb kiindulású melanomák közül a nyálkahártya kiindulású melanomáké. A kaukázusi populációban ezek meglehetősen ritka formák, azonban az ázsiai emberekben az ALM és a nyálkahártya melanoma jóval gyakoribb, ezért náluk gyakrabban vizsgált molekuláris eltérés a KIT mutáció.

Egyéb rosszindulatú megbetegedésekben is előfordulnak KIT mutációk, a mutációs profil azonban eltérő lehet. Például a 8. exon kizárólag AML és masztocitózis által érintett, azonban GIST és melanoma esetén sok az átfedés. Általánosságban elmondható, hogy mutáció leggyakrabban a 11. exonban található, GIST esetén is ez a leggyakoribb lokalizáció, de a 13. és 17. exon is érintett lehet a különböző daganat típusokban. A KIT mutáció pontos elhelyezkedésének az ismerete azért fontos, mert ez befolyásolja a KIT gátló terápia sikerességét, ugyanis nem minden KIT mutáns daganat KIT gátlóra adott érzékenysége egyforma.

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a magyar populációban a KIT gén mutációs gyakoriságát bőrből kiinduló különböző melanoma formákban - mivel az irodalomban csupán Szlovén adatokat találtunk Közép-Európából -, illetőleg meghatározzuk ezen mutációk pontos helyét, hiszen KIT mutáció esetén több mutációs forrópontról (hotspot) beszélhetünk.

BRAF/NRAS mutáns allél frakció (MAF) meghatározás bőr melanoma esetén és annak progressziója során

Az UV-indukálta bőrből kiinduló melanomák esetén a BRAF és NRAS gének funkcionyeréses szomatikus alapító mutációi jól ismertek, melyek a legtöbb esetben vagylagos formában fordulnak elő. Ezen aktiváló mutációk dominánsak, vagyis heterozigóták, azaz a daganat genomjában csupán az egyik allél érintett a mutáció által. Ez azt is jelenti, hogy amennyiben 100% a vizsgált mintában a tumoros sejtek aránya, vagyis nem tartalmaz a környező normál szövetből sejteket, valamint a mutáció által minden egyes daganatsejt érintett, vagyis a mutáció monoklonális formában van jelen, a MAF maximálisan csupán 50% lehet. Ugyanakkor néhány tanulmány rávilágított, hogy nem minden BRAF mutáció esetén igaz a heterozigóta monoklonális megnyilvánulási forma, 50%-nál alacsonyabb és magasabb arányban is leírták a BRAF mutációk előfordulását. Ez több okkal

is magyarázható, például 50% alatti MAF esetén a mutációt „irányító” onkogén nem minden egyes daganat sejtben található meg (szubklonális előfordulás), vagyis az adott onkogénné nézve mutáns és vad allélok is kimutathatók a mintában, valamint az 50% feletti MAF magyarázata lehet a vad típusú allélok elvesztése (heterozigótáság elvesztése). Előfordulhat a kópiaszám növekedése által a mutáns onkogén abszolút vagy relatív felszaporodása is, ami persze önmagában nem befolyásolja a klonalitást (mono/poliklonális).

A klinikai onkológia mindennapi gyakorlatának része az elsődleges daganat irányító mutációjának felkutatása, így van ez melanoma esetében is. Ez az adat persze csak abban az esetben használható fel sikerrel a beteg kezelésében, ha a beteg életét veszélyeztető áttét ugyanazzal az irányító mutációval bír, mint a sokszor évekkorábban már a betegből sebészileg eltávolított elsődleges tumor. Az irodalomban erről pro és kontra is olvashatunk eseteket. Tudományos berkekben a szolid tumorok genetikai sokszínűsége mára már elfogadott tény, de a daganatos betegség előre haladtával bizonyos klónok kisselektálódásával és az agresszívebb klónok felszaporodásával az elsődleges daganatban észlelt genetikai heterogenitás elüthet az áttétben tapasztalhatótól. Vizsgálataink ennek a sokszínűségnek a változásába engednek betekintést az egyazon betegből származó különböző időpillanatban keletkezett elsődleges és sokszor többes áttéti daganat elemzése által, hiszen ahogy már említettem, a betegek döntő többsége a daganatos progresszió későbbi fázisában veszti életét, vagyis az áttétek okozta létfontosságú szervek leállása miatt.

Célul tűztük ki tehát a melanomát irányító onkogének mutáns allél frekvenciájának feltérképezését szervi áttétekben. Ez azért bírhat komoly klinikai jelentőséggel, mert előfordul, hogy az elsődleges tumor BRAF mutációs státuszára alapozva mégsem vezet sikerhez a BRAF+MEK inhibitor kezelés és ennek magyarázata akár az elsődleges és áttéti daganat eltérő BRAF/NRAS MAF-jában is keresendő, hiszen vannak irodalmi adatok arra vonatkozóan, hogy eltérő (magasabb) BRAF MAF esetén eltérő (kedvezőbb) terápiás válasszal számolhatunk.

Módszerek

A kutatáshoz szükséges vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozat betartása mellett előzetes etikai engedély birtokában végeztük (SE TUKEB 114/ 2012).

Általánosságban elmondható, hogy valamennyi mintát először BRAF RFLP-nek vetettünk alá, majd a mutációt Sanger szekvenálással azonosítottuk. Amennyiben a BRAF gén 15. exonjában nem találtunk mutációt, az elemzést NRAS 2. és 3. exon szekvenálással folytattuk. NRAS vad típusú eseteket KIT mutáció analízisnek vetettük alá, a KIT molekuláris epidemiológiai vizsgálatban 5 exont néztünk (9,11,13,17 és 18), a MAF vizsgálatban a 11. és a 13. exonban kerestünk mutációt. A primer tervezést az Array Designer szoftverrel végeztük (Premier Biosoft International, Palo Alto, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) és az előállításukban az Integrated DNA Technologies segített (Coralville, Iowa, Amerikai Egyesült Államok).

Betegek kiválasztása

KIT molekuláris epidemiológiai vizsgálatához összesen 227 db bőrből kiinduló melanómát tartalmazó paraffinos blokkot használtunk fel a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből, a II.sz. Patológiai Intézetből, valamint a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika archívumából, melyeken 2014-2018 között BRAF mutációra vonatkozóan rutin diagnosztikai vizsgálatot végeztek. A bőr melanómák közt akadtak UV-indukálta (SSM, NM, LMM) és nem-UV indukálta (ALM) formák. A 79 BRAF/NRAS dupla vad kohorszból, amelyekben KIT mutációt kerestünk 5 exonban, 55 primer melanoma és 24 metasztázis szerepelt. Lehetőségünk nyílt a KIT mutáció előfordulásra vonatkozó adatainkat egy limitált, 17 elemből álló nyálkahártya melanoma kohorsszal összevetni, amelyben hasonló arányban voltak a BRAF/NRAS vad melanómák képviselve, mint a bőrből kiinduló melanómákat tartalmazó csoportban.

A klonális heterogenitás, MAF változás vizsgálatához egyazon beteg autopsziás metasztázisait és primer paraffinos melanoma blokkját használtuk fel az alábbi intézményekkel való együttműködésben: (1) Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, II.sz. Patológiai Intézet, valamint Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, (2) Fejér Megyei Szent György Egyetemi Oktató Kórház és (3) Zala Megyei Szent Rafael Kórház. A primer és hozzájuk tartozó áttéti melanómákat magába foglaló kohorsz 187 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott blokkból és 2 aspirációs citológiai mintából állt. A 189 szövet 50 betegről származott, vagyis 50 primer melanómát és 139 áttétet tartalmazott. Az agresszív melanoma csoportban férfi dominancia volt megfigyelhető, az átlagéletkor 50 év volt, 4 darab IB stádiumú, regressziót mutató melanoma is beválogatásra került, valamint a primer tumorok majdnem 50%-át kifekélyesedés jellemezte. A leggyakoribb áttétek a központi

idegrendszerből, tüdőből és a májból kerültek ki, melyek körülbelül a metasztázisok felét tették ki. Alacsonyabb számban mellékvese-, emésztőrendszer- és távoli bőr-, illetőleg vese áttéteket is vizsgáltunk, néhány ritka lokalizációjú metasztázis mellett, mint például prostata vagy nyelvgyök.

DNS izolálás

DNS izolálást megelőzően a blokkokból egy hematoxin-eozin festéssel készült metszeten 40x nagyítás mellett meghatározásra került a tumorsejt arány. A tumorsejteket legnagyobb arányban tartalmazó területről makrodisszekcióval végeztük a minták kinyerését és High Pure PCR Template Preparation Kit-et (Roche Holding Ltd., Basel, Svájc) használtunk a DNS izoláláshoz, amit aztán NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Amerikai Egyesült Államok) kvantifikáltunk.

PCR

Reakciónként 1 μ M-os primer koncentrációval dolgoztunk AmpliTaq Gold 360 Master Mix segítségével (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). A PCR reakciók összetérfogata 25 μ l volt és minimum 200 ng genomiális DNS-t tartalmazott, Swift MaxPro Thermal Cycler-t (ESCO Healthcare, Szingapúr) használtunk az alábbi beállításokkal: (1) aktiváció 95 °C-on 10 percig, (2) amplifikáció (38 ciklus): denaturáció 95 °C-on 1 percig, anelláció 55 °C-on 1 percig, extenzió 72 °C-on 2 percig és (3) a végső extenzió 72 °C-on 5 percig. A PCR termékek szeparálását 2%-os agaróz gélen végeztük. A termék kivágása és tisztítása EZ-10 SPIN Column DNA Gel Extraction Kit-tel (Bio Basic Inc., New York, Amerikai Egyesült Államok) történt.

BRAF 15. exon PCR termék RFLP vizsgálata

A BRAF 15. exon specifikus primerekkel végzett PCR után 197 bázispár nagyságú terméket kaptunk, melyet aztán a TspRI enzim segítségével (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) RFLP-nek vetettünk alá, hogy a mutáns BRAF 600-as kodon jelenlétét kimutassuk. Az elemésztett terméket 3%-os agaróz gélen futtatva szeparáltuk és etídium-bromiddal jelöltük, ezek után mutáns BRAF esetén a keletkezett fragmentum a gélen jól láthatóvá vált. Ennek a technikának az alapja, hogy V600 mutáció esetén az enzim nem fér hozzá a restrikciós helyhez, melynek következtében a mutáns allél vizsgálata során egy nagyobb, 212 bázispár nagyságú termék keletkezik, ellenben BRAF vad minta esetén az enzimes emésztés teljességgel végbemegy, ami kisebb, 125 bázispár nagyságú terméket eredményez.

Sanger szekvenálás

A szekvenálási reakcióhoz BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-et (Life Technologies Corporation) használtunk az alkalmazási előíratot pontosan követve és a

terméket egy 4 kapillárisú automata szekvenátoron (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer) futtattuk meg ugyanazokkal a primerekkel, mint amiket a PCR reakcióhoz használtunk. A szekvenáló reakcióhoz használt terméket a szekvenálást megelőzően BigDye X Terminator™ Purification Kit-tel (Life Technologies Corporation) tisztítottuk meg. A keletkezett nukleotid szekvenciát a Chromas Lite Version 2.1 szoftver segítségével a NCBI Nukleotid BLAST Humán Adatbázisához hasonlítottuk, így azonosítottuk be a mutációkat. A fenti módon végzett Sanger szekvenálás érzékenysége 15%.

Piroszekvenálás

Azon néhány minta esetében, ahol a primer és a hozzá tartozó áttét mutációs analízise Sanger szekvenálással eltérő eredményt adott, egy nagyobb szenzitivitású módszerrel, a piroszekvenálással ellenőriztük méréseinket, amely már 2% mutáns allél esetén pozitív eredményt jelez. PyroMark Q24 rendszeren (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük méréseinket Therascreen NRAS Pyro Kit és Therascreen BRAF Pyro Kit (Qiagen) segítségével az alkalmazási előiratban szereplő információkat követve. A BRAF gén 601-es kodonjának vizsgálatához szükséges primert a korábban említett szoftver segítségével terveztük és az Integrated DNA Technologies által gyártattuk le. A szekvenáló reakció összesen 25 µl-es elegye a következőket tartalmazta: 5 µl genomiális DNS, 12.5 µl a 2x PyroMark PCR MasterMix-ből, 2.5 µl a 10xCoral-Load koncentrátumból, 1 µl PCR primer (BRAF vagy NRAS) és 4 µl víz. A PCR reakció az alábbi volt: 15 perc 95 °C, (42 ciklus) denaturáció 20 másodperc 95 °C-on, anelláció 30 másodperc 53 °C, extenzió 20 másodperc 72 °C, végső extenzió 5 perc 72 °C. Az elegyből 10 µl-t adtuk a piroszekvenáló reakcióhoz. A pirogramot a PyroMarkQ24 szoftver segítségével értelmeztük, a görbén észlelt csúcsok magassága alapján határoztuk meg a mutáns allél vadhoz viszonyított százalékos arányát.

MAF meghatározás

Egy, a piroszekvenáláshoz hasonló semiquantitativ módszert használtunk a Sanger szekvenogramok alapján végzett mutáns allél százalékos arányának meghatározáshoz: az érintett nukleotidnál kirajzolódó mutáns allélt jelző görbe nagyságát viszonyítottuk a vad allél görbéjéhez. Ezután a kapott eredményt a mintára jellemző T/N aránnyal korrigáltuk. Az így számított MAF értékeket 3 csoportba soroltuk nagyságuk szerint: alacsony (15%-nál kisebb), közepes (15-40% között) és magas (40% feletti) MAF.

Statisztika

SPSS 20.0 (IBM Corporation, Chicago, Illinois, Amerikai Egyesült Államok) szoftvert használtunk a klonális heterogenitás, MAF változás vizsgálatához, χ^2 próbát a KIT molekuláris epidemiológia meghatározáshoz.

Leíró statisztikát alkalmaztunk az irányító mutációk lokáció specifikus eloszlásának meghatározásához valamint a mutációk gyakoriságának számításához a primer tumorok esetén.

Az egymáshoz tartozó primer és áttéti melanomák mutáns allél frekvenciája (MAF) közötti összefüggést kétmintás t-próbával adtuk meg a BRAF mutáns minták esetén valamint nem parametrikus Wilcoxon-féle rangösszegteszttel az NRAS mutáns minták esetében, az ebben a csoportban lévő alacsony elemszám miatt, ahogyan az áttétek különböző előfordulási helyét illetően is ezzel a módszerrel számoltunk.

Khí-négyzet próbát és a Fisher-egzakt tesztet hívtuk segítségül a három MAF kategória (alacsony, közepes és magas) közti korreláció elemzéséhez az elsődleges és áttéti daganat párok közt BRAF és NRAS mutáció esetén egyaránt, valamint a tumorprogresszió során bekövetkező MAF változás megadásához.

A tumorprogresszió során bekövetkező allél frekvencia változást négyféle kategóriába soroltuk attól függően, hogy a primer tumorhoz viszonyítva az áttétben észlelt MAF nagyságrendileg nem változott, növekedett, csökkent vagy a mutáns allél az áttétben nem volt már egyáltalán kimutatható.

Eredmények

Magyarországi KIT molekuláris epidemiológia, KIT mutáció meghatározás

A hazai KIT molekuláris mintázatról szóló vizsgálatunkhoz 227 darab bőrből kiinduló melanomát használtunk, később 17 darab nyálkahártyáról kiinduló melanoma is bevonásra került.

Melanoma esetén a leggyakrabban mutáció által érintett onkogén, vagyis a BRAF gén 45.4%-ban volt mutáns (103/227). A 124 BRAF vad minta tesztelése során 20%-ban sikerült NRAS mutációt kimutatni (45/227).

Ezzel a szelektáló mechanizmussal állt elő egy 79 tagú BRAF/NRAS vad, vagyis dupla vad bőr melanoma kohorsz, melyben zömével UV-indukálta melanomák voltak képviselve, csupán a csoport harmadát tették ki a nem-UV indukálta melanomák (ALM). Miután a KIT gén 5 exonját (9,11,13,17,18) átvizsgáltuk ezekben a mintákban, 43.04%-nak adódott a KIT mutáció (34/79). A nem-UV indukálta dupla vad csoportban a mutáns esetek száma szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, mint az UV-indukálta leggyakoribb melanoma altípusokat felvonultató csoportban (58.8% szemben 31.1%, $p=0.014$).

Amennyiben a dupla vad mintában kimutatott KIT mutációs gyakoriságot visszaszámoljuk az összes esetre (227 minta), eléggé magas arányt, 15%-ot kapunk.

Rendelkezésünkre állt a bőr melanomából származó adatainkat nyálkahártya melanomával összevetni, KIT mutáció incidenciája nagyságrendileg egyformának adódott a két csoportban (7/17, 41.2%). Három mintát érdemes kiemelni, melyeket miután Sanger szekvenálást követően piroszekvenáltunk is, BRAF és KIT kettős mutációt hordoztak bizonyítva a primer tumor heterogenitását, mely a nagyobb érzékenységű módszerrel kimutatható volt.

Pontos exon és kodon érintettség a KIT mutáns esetekben

A 34 KIT mutáns bőr melanomában összesen 38 KIT mutációt sikerült azonosítani, amely úgy adódott, hogy két páciens dupla KIT mutációt hordozott, egy pedig triplát. Miután mind az 5 exont megvizsgáltuk, a 11. exont találtuk a mutációk által leggyakrabban érintettnek (44.7%). A második leggyakrabban mutációt hordozó exon KIT gén esetén a 9. volt 21.1%-kal, ezt követte a 13. és 17. exon egyaránt 13.2%-kal, végül a 18. exon 7.9 %-kal. 9. és 11. exon érintettségben az UV-indukálta és ALM formák közt nem találtunk szignifikáns különbséget, ugyanakkor 18. exon mutációt csak UV-indukálta melanoma esetén láttunk, illetőleg 13. és 17. exon mutáció ALM-ben gyakoribb volt.

A 7 KIT mutáns nyálkahártya melanoma esetében a 9. exon volt a leggyakrabban mutáns (37.5%), ezt követte a 13. és 17. exon egyaránt 25-25%-kal, majd csak ez után jött a 11. exon. Ebben a kohorszban is találtunk dupla KIT mutációt hordozó melanomát.

Amennyiben az egyes KIT exonok tekintetében mutációs forrópontot szeretnénk meghatározni, az alábbiak jelölhetők ki: a 9. exonban 482/491/492 kodonok, a 11. exonban 559/570/572 kodonok, a 13. exonban 642-es kodon, a 17. exonban 822-es kodon és a 18. exonban 853-as kodon. Ezen kiemelt kodonok környezetében klaszterekbe rendeződve további KIT mutációk helyezkednek el.

Tumorprogresszió során észlelt klonális heterogenitás és mutáns allél frekvencia (MAF) változás

Ehhez a vizsgálathoz 50 melanomás beteg primer és távoli áttéti daganatát használtuk fel, közülük 29 esetben egyazon betegből származó több áttétet is módunkban állt elemezni. Összesen 189 mintát Sanger szekvenáltunk 3 génre, melyben tehát 50 primer melanoma és 139 hematogén metasztázis szerepelt, ezek 18 különböző szervből származtak.

Ami az irányító mutáció meghatározását illeti, 32/50 primer melanoma, vagyis az esetek 64%-a hordozott BRAF mutációt és 12/50, vagyis 24% NRAS mutációt. KIT mutáns esetet nem sikerült igazolni ebben a kohorszban. Ennek magyarázata a magyarországi KIT molekuláris epidemiológia tárgyú publikációnk fényében többek közt az is lehet, hogy itt BRAF/NRAS vad, vagyis dupla vad esetek 6/50, 12%-ban fordultak elő, míg a másik vizsgálatban ennél jóval magasabb, 79/227 35% arányban.

Az áttétek vizsgálata során a minták 73%-a hordozott BRAF mutációt (101/139), 17%-a NRAS (24/139) mutációt és 10% volt a BRAF/NRAS/KIT tripla vad melanoma áttétek aránya. Az elsődleges és áttéti daganatok közti mutációs státuszbeli eltérés nem bizonyult szignifikánsnak (BRAFMut/NRASmut/tripla vad $p=0.25/0.29/0.70$).

A BRAF mutációk a 600-as és 601-es kodonra lokalizálódtak, a leggyakoribb V600E mutáció a 32 BRAF mutáns melanoma közül 26 esetben, vagyis 81.25%-ban volt kimutatható, V600K 5 esetben (15.6%). Igazoltunk egy ritka, K601E mutációt egyetlen betegnél (1/32 3.15%). NRAS mutációk esetén Q61K és Q61R egyaránt 5-5 esetet érintett a 12-ből (42-42%), egy betegnél Q61L mutáció (8%) és egy betegnél G12C mutáció (8%) került leírásra. A betegek túlélését a mutációs státusz nem befolyásolta.

Az elsődleges és az áttéti melanomák mutációs allél frekvenciája (MAF)

Mind BRAF, mind NRAS mutáció esetén igen széles tartományban mozgott a MAF (2.2-80.3% és 4.6-71.0%). Az egyes minták közt észlelt meglepően eltérő MAF mögött nem állhatott eltérő tumorsejtarány, mivel ezt figyelembe véve adtuk meg a MAF-ot, valamint extrém alacsony és extrém magas tumorsejtarány arány esetén egyaránt láttunk alacsony illetve magas MAF-ot.

BRAF klonális szelekció tumorprogresszió során

A heterozigóta státusz miatt a MAF-ot 50% körül vártuk, de a BRAF-MAF 24.7+/-16.3-nak adódott, ahogyan az NRAS-MAF 30.7+/-20.9-nek. A BRAF mutáns primer és áttéti minták közt a MAF emelkedés szignifikánsnak adódott.

Szignifikáns MAF emelkedés szervspecifikus BRAF mutáns áttétekben

Bár a leggyakoribb áttét daganatos megbetegedések esetén és a mi mintánkban is a központi idegrendszer és a májat érinti, méréseink alapján a BRAF mutáns esetek MAF-ja a tüdő-, mellékvese-, és gyomor-bélrendszeri metasztázisok esetében mutatott szignifikáns emelkedést. NRAS mutáns daganatoknál nem tapasztaltuk szignifikáns MAF változást a különböző lokalizációjú áttétekben.

Primer melanoma MAF profilját megtartó, illetve azt enyhe, vagy kifejezett módon váltó metasztázisok

Az egyes betegeket külön-külön szemlélve három mintázatra lettünk figyelmesek. Az első csoportba azok az esetek tartoznak, amelyek MAF-ja nem változik progresszió alkalmával, a másodikba azok, amelyek enyhe növekedést/csökkenést mutatnak MAF tekintetében az áttétekben a primer tumorhoz viszonyítva (alacsonyból közepes, közepesből magas és fordítva), a harmadikba pedig azok a betegek sorolhatók, akiknél kifejezett MAF változást (magasból alacsony, vagy alacsonyból magas) mértünk. Ebben a tekintetben szervspecifikus eltérést nem találtunk.

A 44 (BRAF vagy NRAS) mutáns primer melanoma 129 metasztázisát tekintve két BRAF mutációt és egy NRAS mutációt hordozó betegnél, összesen 4 áttétben (3.1%) a MAF változás olyan extrém fokúnak bizonyult, hogy nem lehetett a mutáns allélt detektálni az áttétben még a Sangernél nagyobb szenzitivitású pirosekvenálással sem. Érdekes tény, hogy ezek az áttétek a májból és a lépből kerültek ki.

Magas, közepes és alacsony MAF kategóriába sorolható áttétek lehetnek homogének vagy heterogének a többes áttétel bíró betegek esetén

Eredményeink szemléltetése kedvéért három kategóriába soroltuk a kapott MAF értékeket, mely tartományok a heterozigótaság meglétén és a mintáinkban észlelt 80% körüli tumorsejtarányon alapultak: alacsony MAF 15% alatt, közepes MAF 15-40% közt és magas MAF 40% felett.

Mindkét „irányító” mutáció esetén találtunk homogén és heterogén áttéttel bíró betegeket a többes áttétekre vizsgált páciensek közt. Homogén metasztázis kifejezéssel azt jelöltük, amikor is a MAF ugyanazon kategóriába sorolható az egyes áttétekben, ez a 32 BRAF mutáns betegből 23-nál volt megfigyelhető (72%) és a 12 NRAS mutáns betegből pedig 9-nél (75%). Heterogén metasztázis esetén a az áttétek közt eltérő MAF kategóriákat figyeltünk meg, ez a 32 BRAF mutáns betegből 9-et (28%), a 12 NRAS mutánsból pedig 3-at érintett (25%). Sem

a BRAF, sem az NRAS mutáns áttétek esetén észlelt homogén vagy heterogén mintázat nem bizonyult szignifikánsnak.

Klinikai szempontból viszont a kifejezett MAF váltó esetek kiemelt jelentőséggel bírnak: 32 betegből 6 (18.75%) a BRAF mutáns homogén esetek közül, 4 (12.5%) a BRAF mutáns heterogén esetek közül és 2 (16.7%) a 12 NRAS mutáns esetek közül tartoztak a kifejezett MAF váltó csoportba.

Pozitív szelekcióra utaló eltérés volt észlelhető a BRAF mutáns melanomák tumorprogressziója során amennyiben annak tekintjük a közepesről magas (6/32), alacsonyról közepes (3/32), vagy alacsonyról magas (7/32) MAF-ra történő változást az áttétben a primer daganathoz képest, összességében 16/32 50%, ha a magasról közepesre (3/32), közepesről alacsonyra (3/32) vagy magasról alacsonyra (3/32) történő MAF változáshoz hasonlítjuk, mely összességében 9/32 28.1%.

Következtetések

KIT molekuláris epidemiológia vizsgálat

Bőr melanoma KIT molekuláris epidemiológiára vonatkozó Közép-Európából származó megbízható adatot nehéz találni az irodalomban. Ennek az ismerete azért lenne fontos, mert a KIT mutációs gyakoriságot befolyásolják a geográfiai viszonyok, valamint megléte esetén célzott terápiában részesülhetnek a páciensek.

Több száz magyar betegből álló reprezentatív melanoma kohorszot vizsgálva a BRAF mutáció 45.4%-nak, az NRAS mutációs ráta pedig 20%-nak adódott, amely adatok egybecsengenek egyéb etnikai csoportokéval és más földrajzi régióból származó adatokkal. Azonban klinikusok és kutatók fejében általánosan élő vélemény, hogy a KIT mutációs arány bőrből kiinduló melanomák esetén alacsony, ezért nem is gyakran végzett vizsgálat. Ha utánanézzünk az irodalomban, 9.5% körüli értéket találunk, de az adatokat nagy szórás jellemzi. A KIT mutáns melanoma néhány speciális tulajdonsággal rendelkezik, ezért ezekben az esetekben fokozottan gondolni kell KIT mutáció vizsgálatra: idősebb betegekben gyakoribb, krónikus napfény ártalommal szoros összefüggésben áll és gyakran nyálkahártya melanoma vagy az akrákat érintő melanoma (ALM) képében jelentkezik. Példának okáért álljon itt egy velünk szomszédos ország, Szlovénia KIT mutációs frekvenciája, mely 1.3%, ami igen alacsony, hogyha az olaszországi adatokhoz hasonlítjuk, ami 10% körüli (UV indukálta és nem-UV indukálta melanoma formák), ahogyan 10% körül mozog egy cikk szerint a franciaországi KIT mutációs ráta is (nyálkahártya melanoma). A nagy szórás oka a vizsgálatokba bevont eltérő melanoma altípusok, melyek érzékeny paraméterei a KIT mutációs rátának, illetőleg a mutáció kimutatásának módja, főként a vizsgált exonok száma, mert a legtöbb elemzés csupán a GIST-re jellemző exonokat vizsgálta, mások pedig egyéb exonokat is.

Eredményeink a magyarországi KIT mutációra vonatkozóan 15%-ot mutattak, ami eléggé magasnak tűnhet, azonban megbízható, mert kutatócsoportunk 5 exont is megszekvenált és meglehetősen nagy elemszámú és homogén mintán dolgoztunk.

A BRAF/NRAS dupla vad bőr melanoma kohorszunk KIT mutációs rátája megegyezett az ugyan kis létszámú, de szintén BRAF/NRAS dupla vad nyálkahártya melanoma csoportéval. Fontos azonban megemlíteni, hogy nyálkahártya melanomák esetén sokkal ritkább a BRAF/NRAS mutáció előfordulása, ezért szükségszerűen a KIT mutációs ráta magasabbnak adódik.

Elgondolkodtató, hogy az általunk vizsgált melanoma csoport KIT mutációs mintázata az irodalomban közölt GIST (mint a KIT mutáns daganatok prototípusa) KIT mutációs mintázatával mely pontokon egyezik vagy tér el. Irodalmi adatok alapján GIST esetén a KIT gén 11. és 9. exonjának mutációi a leggyakrabbak (~70% and 10%), míg melanoma esetén

nem egységesek a közlemények, hiszen sajnálatos módon nagy részük nem mind az 5, leggyakrabban számításba kerülő exont vizsgálja. Méréseink alapján bőrből kiinduló melanoma esetén a 11. exonban fordulnak elő leggyakrabban mutációk (44.7%), de még így is alacsonyabb ez az arány, mint GIST esetén. A második helyen a 9. exon áll 21.1%-kal, amely arány azonban több mint a duplája, mint GIST-ben. Ezeket követi a 13., 17. és 18. exonban fellelhető mutációk, melyeknek vizsgálata gyakoriságuk alapján véleményünk szerint szintén nem elhanyagolható melanoma esetén, még akkor sem, ha GIST-ben előfordulási valószínűségük összesen is csak 20% alatt van. Adataink a Kínából közölt adatokkal nagyjából összeesengenek, azonban ott a második leggyakoribb mutáció által érintett exon a 13-as volt.

Amennyiben a mutációs forrópontok közti különbséget tekintjük át GIST és melanoma esetén, a 9. exon esetében az 502/503 kodon a leggyakrabban érintett GIST-ben, vizsgálataink alapján ugyanakkor melanomában a 491/492 kodon. A 11. exon 557/558-as kodonjában megegyezik a mutációs hotspot GIST és melanoma esetén, ugyanakkor a szomszédos, vagyis 559-es kodon mutációja melanoma esetén szintén meglehetősen gyakori. A 13. exonban GIST és melanoma ugyanazon a mutációs forróponton osztozik, amely a 642-es kodon, habár melanoma a környező kodonokat is érintheti. A 17. exonban mindkét daganat azonos hotspot-tal bír, ez a 822-es kodon, míg a 18. exonban GIST esetén a KIT mutáció a 842-es kodont érinti, melanomában pedig nem. Klinikai jelentősége van a GIST és melanoma közti hasonló, vagy különböző mutációs hotspot-oknak akkor, amikor aktiváló mutációról beszélünk és gyógyszeres gátlás sikerrel alkalmazható, mivel a különböző KIT inhibitorokkal GIST-ben szerzett tapasztalatok átültethetőek melanoma kezelésére. A melanomában leírt magyarországi és kínai KIT mutációs forrópontok szinte egyeznek.

Az onkológusoknak KIT inhibitor terápiával szerzett tapasztalata nagyobb, mint a dermatoonkológusoknak, mivel melanoma mellett GIST, AML és pajzsmirigy daganat esetén is sikerrel alkalmazható. GIST esetén amennyiben a KIT mutáció a 9., 11., 13. exont érinti, imatinib vagy sunitinib adása sikerrel járhat, míg AML esetén nincs információnk a 17-es exon (816-os kodonjának) mutációja esetén a KIT inhibitorok hatásosságáról. Pajzsmirigy karcinóma is lehet KIT mutáció hordozó, ebben az esetben a 9. exon 490-es kodonjában és a 11. exon 553, 557, 559 és 576-os kodonjában észlelt mutációk reagáltak a KIT inhibitor kezelésre, a 17-es exon (820-as kodonjának) mutációja szintén nem.

Melanoma esetén több vizsgálat is történt KIT inhibitor imatinib adásával. A 9-es exonban észlelt mutációk esetén nem sikerült még részleges választ sem elérni, az inkább sunitinib érzékeny, azonban a 11-es exonban az alábbi kodonokat érintő KIT mutáció esetén viszont

igen: 576, 577, 557, 559, 560, továbbá a 13. exon 642-es kodonjának mutációja esetén is leírtak részleges válaszreakciót imatinibre.

Summa summárum, mivel a BRAF/NRAS vad melanomák több, mint 50%-a hordoz KIT mutációt a 11. és 13. exonban, ami egy jelentős betegpopuláció, akik KIT inhibitorral kezelhetőek lennének, ezért legalább ennek a két exonnak a vizsgálata elengedhetetlen lenne a melanoma altípusától függetlenül.

Tumorprogresszió során észlelt klonális heterogenitás és mutáns allél frekvencia (MAF) változás

KIT mutáns mintát ebben a vizsgálatban nem találtunk, melynek magyarázata többek közt az is lehet, hogy a klonális heterogenitás vizsgálatban BRAF/NRAS vad, vagyis dupla vad esetek 6/50, 12%-ban fordultak elő, míg a KIT epidemiológia tárgyú kutatás során elemzett mintákban ennél jóval magasabb, 79/227, 35% arányban fordult elő dupla vad minta, valamint esetlegesen az is okolható a KIT mutáns esetek távol maradásáért, hogy itt az igazoltan célzott terápiával bíró mutációkat néztük, vagyis a KIT gén esetén csupán a 11. és a 13. exont vizsgáltuk.

Nagy számú párosított primer és áttéti melanomán végzett mutáns allél frekvencia vizsgálatunk extrém tumor heterogenitást mutatott mind BRAF mind NRAS mutációt hordozó mintákban, amely heterogenitás háttérében nem állhatott T/N arány eltolódás, sem technikai ok.

Megállapítottuk, hogy BRAF mutáció esetén a MAF az áttétekben növekedett a primer tumorhoz viszonyítva, amelyből az agresszívebb, mutáns klón kisselektálódására következtethetünk. A BRAF mutáns klónok növekedése az áttétekben elérte a szignifikancia határát. Ezzel ellentétben az NRAS mutáns klónok áttétekben való felszaporodása nem volt szignifikáns. Miután az egyes minták MAF-ját nagyságuk alapján három kategóriába soroltuk (> 40% magas, 15-40% közepes és < 15% alacsony), a BRAF mutáns klónok felszaporodása még szembe tűnőbb volt. Primer melanomák esetén a magas, közepes vagy alacsony MAF incidenciák közt nem volt különbség, ellenben az áttétekben a magas MAF kategória került többségbe (15/32, 46.8%) és az alacsony MAF előfordulási valószínűsége csökkent (2/32, 6.25%).

50%-nál magasabb és 15%-nál alacsonyabb MAF értékkel is találkoztunk mind primer daganatok, mind áttétek esetében. Extrém magas MAF érték mögött állhat a mutáns gén amplifikációja, vagy a vad allél elvesztése, ahogyan a túlságosan alacsony MAF háttérében is lehet a mutáns allél elvesztése vagy a vad allél amplifikációja szomatikus irányító mutációk esetében, amelyeket domináns heterozigóta formában hordoznak a sejtek. A fenti kérdés

tisztázását kutatócsoportunkban aktuálisan zajló kópiaszám elemzésen alapuló vizsgálatról várjuk.

Elsőként írtuk le a BRAF mutáns klónok szignifikáns felszaporodását a tüdő, mellékvese, gyomor-bélrendszer és vese vonatkozásában, azonban a központi idegrendszerben és a májban ez nem volt szignifikáns. Nem túlzó talán az a következtetés, hogy bizonyos szervi preferencia genetikai alapjait találtuk melanoma progressziója során. Eredményeink bizonyos vonatkozásban ugyan ellentmondanak a nemrég közölt irodalmi adatoknak, mely szerint a BRAF/NRAS mutáns melanomák nagyobb valószínűséggel adnak áttétet a központi idegrendszerbe és májba, valamint hogy az NRAS mutáns melanomák előszeretettel progrediálnának a tüdőbe. Érdekes lenne látni egy nagyobb elemszámon történő vizsgálat eredményét, hogy vajon a primer melanoma irányító mutációjának allél frekvenciája utalhat-e a későbbiekben kialakult szervi áttétek lokalizációjára.

Az általuk vizsgált anyagban komoly előnyt jelentett, hogy számos esetben egyazon betegből származó elsődleges daganatnak több hematogén áttétjét is módunkban állt elemezni. Kifejezett inter-metasztatikus MAF heterogenitást láttunk BRAF esetén 28.2%-ban, NRAS esetén 25%-ban, ugyanakkor a minták döntő többségében az áttétekben mért mutáns allél gyakoriság nagyságrendileg megegyezett.

BRAF és NRAS mutáns melanomák progresszióban bizonyos vonatkozásban eltérést találtunk. Az NRAS mutáns melanomában szenvedő betegek áttétjei 50%-ben megtartották a primer daganat MAF-ját, ez a BRAF mutáns melanomákban ez kevesebb arányban volt megfigyelhető (31.3%). Relatív nagy számban láttuk a BRAF mutáns esetekben a primer tumor alacsony MAF-járól az áttétben magas MAF-ra történő váltást mind a homogén, mind a heterogén többes áttéttel bíró esetekben, ugyanakkor NRAS mutáns daganatok esetében ez nem volt elmondható.

Molekulárisan célzott daganat ellenes terápia a legtöbb esetben, így melanomában is az elsődleges tumor „irányító” mutációjának kimutatásán alapszik. BRAF inhibitorok sikerrel adhatók BRAF mutáns primer tumorról bíró betegek nagy többségének progresszió esetén, ugyanakkor egy kisebb részük a várakozással ellentétben nem reagál a kezelésre és a valósághoz tartozik az is, hogy akik eleinte pozitív választ mutatnak, azoknál is rezisztencia alakul(hat) ki a későbbiekben. A BRAF inhibitorok átmeneti hatása, vagy éppen hatástalansága hátterében is a mutáns allél extrém fokú heterogenitása húzódhat meg, mely a mi esetünkben is széles skálán (2.2-80.3%) mozgott. Továbbá a multiplex áttéttel bíró esetek szervenként eltérő terápiás válasza mögött is állhat mutáns klón heterogenitása és progresszió során bekövetkezett klonális szelekció. Ez a fajta sokszínűség kisebb mértékben ugyan, de NRAS mutáns daganatok esetében is kimutatható volt vizsgálatunkban.

A primer tumor molekuláris státuszán alapuló célzott kezeléssel kapcsolatos döntéshozatal esetinket nézve csupán 3.1%-ban bizonyult volna helytelennek 2%-os mutáció detekciós határ mellett. Azonban vizsgálataink nyomán kihangsúlyozandó, hogy nem elég a mutációs státusz ismerete a sikeres kezeléshez, hiszen a mutáns allél előfordulási gyakoriságát tekintve mind a primer tumor, mind az áttét heterogén és ez nem az esetlegesen eltérő T/N aránynak köszönhető. Hangsúlyozottan fontos a kezelendő áttétek vizsgálata, nem utolsósorban azért is, mert a beteg haláláért melanoma esetén az áttét okolható, nem pedig az apró primer tumor. Eredményeink nem csupán alátámasztják a multiklonalitás elméletét, hanem a metasztatikus kaszkád megértéséhez is talán közelebb vittek bennünket, valamint a klinikai döntéshozatalt is befolyásolják. Az a benyomásunk, hogy a célzott terápiák kezdetben nagyon is kecsegtető eredménye, majd a gyakorlati alkalmazás során megismert korlátai mögött az egyes szervi áttétekben fellelhető irányító mutációt hordozó klónok relatív alacsony mennyisége állhat. Feltétlenül fontos lenne igazolni, a MAF célzott terápiában betöltött prediktív szerepét egy nagy elemszámú, retrospektív kohorszban, mivel az általunk vizsgált esetek közül csupán 3 beteg részesült célzott terápiában.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

(1)**Doma V**, Kárpáti S, Raso E, Barbai T, Timar J. Dynamic and unpredictable changes in mutant allele fractions of BRAF and NRAS during visceral progression of cutaneous malignant melanoma. *BMC Cancer*, 2019. 19(1): p. 786.

(2)**Doma V**, Barbai T, Beleaua MA, Kovalszky I, Raso E, Timar J. KIT mutation incidence and pattern of melanoma in Central Europe. *Pathol Oncol Res*, 2020. 26: 1 pp. 17-22.

Egyéb publikációk:

(1)Kim Y, Gil J, Pla I, Sanchez A, Betancourt LH, Lee B, Appelqvist R, Ingvar C, Lundgren L, Olsson H, Baldetorp B, Kwon HJ, Oskolas H, Rezeli M, **Doma V**, Karpáti S, Szasz AM, Nemeth IB, Malm J, Marko-Varga G. Protein Expression in Metastatic Melanoma and the Link to Disease Presentation in a Range of Tumor Phenotypes. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(3). doi: 10.3390/cancers12030767.

(2)Gil J, Betancourt LH, Pla I, Sanchez A, Appelqvist R, Miliotis T, Kuras M, Oskolas H, Kim Y, Horvath Z, Eriksson J, Berge E, Burestedt E, Jönsson G, Baldetorp B, Ingvar C, Olsson H, Lundgren L, Horvatovich P, Murillo JR, Sugihara Y, Welinder C, Wieslander E, Lee B, Lindberg H, Pawlowski K, Kwon HJ, **Doma V**, Timar J, Karpáti S, Szasz AM, Nemeth IB, Nishimura T, Corthals G, Rezeli M, Knudsen B, Malm J, Marko-Varga G. Clinical protein science in translational medicine targeting malignant melanoma. *Cell Biol Toxicol*. 2019 Aug;35(4):293-332.

(3)Timar J, Vizkeleti L, **Doma V**, Barbai T, Raso E. Genetic progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 2016. 35(1): p. 93-107.

(4)Imredi E, Toth B, **Doma V**, Barbai T, Raso E, Kenessey I, Timar J. Aquaporin 1 protein expression is associated with BRAF V600 mutation and adverse prognosis in cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2016 Jun;26(3):254-60.

(5)**Doma V**, Gulya E. Genetic diversity and immunological characteristics of malignant melanoma; the therapeutic spectrum. *Orv Hetil*. 2015 Apr;156(15):583-91.

(6)**Doma V**, Tamasi B, Sardy, M. Paraneoplastischer Pemphigus.

Hautnah Dermatologie. 2017 Nov; 33(6): 44-49. doi: 10.1007/s15004-018-5940-8.