

# A *SMARCB1* gén genetikai és epigenetikai vizsgálata epithelioid sarcomában

Doktori értekezés

**Papp Gergő**

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sápi Zoltán egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Szőke János főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa egyetemi tanár, MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Borka Katalin egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Lazáry Áron tudományos igazgató, Ph.D.

Budapest

2014

# 1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK .....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
3. BEVEZETÉS.....	8
3. 1. Az epithelioid sarcoma .....	8
3. 2. A SWI/SNF kromatin-átrendező komplex .....	12
3. 3. A <i>SMARCB1</i> gén .....	13
3. 3.1. Nevezéktan .....	13
3. 3.2. A <i>SMARCB1</i> gén funkciói .....	14
3. 3.3. <i>SMARCB1</i> deficiens tumorok .....	15
3. 4. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok.....	16
3. 4.1. Hiszton metiláció .....	16
3. 4.2. DNS metiláció .....	18
3. 4.3. A mikroRNS-ek ( <i>miRNS</i> -ek) mint poszttranszkripcionális szabályozó molekulák .....	19
3. 4.3.1. A <i>miRNS</i> -ek jellemzői és képződésük folyamata .....	19
3. 4.3.2. A <i>miRNS</i> -ek nevezéktana .....	20
3. 4.3.3. A <i>miRNS</i> -ek szerepe a daganatképződésben .....	21
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	23
5. MÓDSZEREK.....	24
5. 1. Vegyszerek, oldatok, pufferek .....	24
5. 2. Szövetminták .....	24
5. 3. Immunhisztokémia.....	26

5. 4. Floureszcens <i>In Situ</i> Hibridizáció (FISH).....	27
5. 5. DNS és RNS izolálás .....	28
5. 6. Polimeráz láncreakció (PCR).....	28
5. 7. A PCR termékek elválasztása, detektálása és tisztítása .....	31
5. 8. A <i>SMARCB1</i> gén szekvencia analízise .....	32
5. 9. A DNS biszulfid konverziója.....	35
5. 10. Metiláció-specifikus PCR (MSP) .....	36
5. 11. Lézer mikrokimetszés (LCM- Laser Capture Microdissection) .....	39
5. 12. Reverz transzkripció (RT).....	39
5. 13. <i>In silico</i> miRNS target predikció .....	41
5. 14. Sejtkultúra és miRNS tranziens transzfekció.....	41
5. 15. Valós-idejű kvantitatív PCR (q-RT-PCR) .....	43
5. 16. Immuncitokémia .....	45
5. 17. Statisztikai módszerek .....	45
6. EREDMÉNYEK.....	46
6. 1. Szöveti és immunhisztokémiai vizsgálatok .....	46
6. 2. <i>SMARCB1</i> genetikai vizsgálatok .....	48
6. 2.1. <i>Floureszcens In Situ</i> Hibridizáció.....	48
6. 2.2. A <i>SMARCB1</i> gén szekvencia analízise .....	49
6. 2.3. A <i>FISH</i> eredmények validálása .....	51
6. 3. A <i>SMARCB1</i> mRNA expressziós szintjének meghatározása .....	53
6. 4. <i>SMARCB1</i> epigenetikai vizsgálatok .....	55
6. 4.1. <i>SMARCB1</i> promóter metiláció.....	55
6. 4.2. <i>EZH2</i> mediálta <i>H3K27</i> trimetiláció .....	56
6. 4.3. A <i>SMARCB1</i> mRNA-t célzó miRNS-ek azonosítása.....	57

6. 4.3.1. In silico target predikció .....	57
6. 4.3.2. Target predikciós programokkal kiválasztott miRNS-ek expressziója epithelioid sarcomában .....	58
6. 4.4. <i>A miRNS-ek hatásának funkcionális vizsgálata sejtenyészetekben</i> .....	59
6. 4.4.1. A miR-206, miR-381, miR-671-5p és miR-765 géncsendesítés hatása a SMARCB1 génexpresszióra.....	59
6. 4.4.2. A miR-206, miR-381 és miR-671-5p géncsendesítés hatása a SMARCB1 fehérje expressziójára .....	61
7. MEGBESZÉLÉS .....	64
8. KÖVETKEZTETÉSEK.....	72
9. 1. ÖSSZEFOGLALÁS .....	73
9. 2. SUMMARY .....	74
10. IRODALOMJEGYZÉK .....	75
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	90
11. 1. Az értekezés témájában megjelent közlemények .....	90
11. 2. Egyéb témában megjelent közlemények.....	90
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	92

## 2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABL:	„Abelson murine leukemia viral oncogene”
ANOVA:	varianciaanalízis („Analysis of variance”)
APC:	„Adenomatous polyposis coli”
ATP:	adenozin-trifoszfát
BAF:	„Brg1/Brm Associated Factors”
BCR:	„Breakpoint cluster region”
CDK:	Ciklin dependens kináz
cDNS:	„complementary DNS”
Cp:	„crossing point”
DAB:	3-3' diamino-benzidin
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
ddNTP:	didezoxiribonukleotid-trifoszfát
DNS:	deoxiribonukleinsav
dNTP:	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
EDTA:	etilén-diamin-tetraecetsav
EED:	„embryonic ectoderm development”
EMA:	Epithelialis Membrán Antigén
ESR1:	ösztrogén receptor 1 („oestrogen receptor 1”)
EZH2:	„Enhancer of zeste homologue 2”
FBS:	fötális borjú szérum („fetal bovine serum”)

FFPE:	formalin-fixált, paraffinba ágyazott („formalin-fixed paraffin embedded”)
FISH:	fluoreszcens in situ hibridizáció
FLI1:	„Friend leukemia integration 1 transcription factor”
GAPDH:	glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
H3K27me3:	hiszton H3 lizin 27 trimetiláció
HDF $\alpha$ :	„human dermal fibroblast $\alpha$ ”
HMT:	hiszton-metiltransferáz
IDI1:	„Inhibitor of Differentiation 1”
INI1:	„INtegrase Interactor 1”
LCM:	lézer mikrokimetszés („laser capture microdissection”)
LSGS:	„Low Serum Growth Supplement”
MEM:	„minimum essential medium”
MET:	„met proto-oncogene”
miRNS, miR:	mikroRNS
MLPA:	multiplex ligációfüggő próba amplifikáció
mRNS:	hírvivő („messenger”) RNS
MRT:	malignus rhabdoid tumor
MSP:	metiláció-specifikus PCR
NCBI:	„National Center for Biotechnology Information”
NOTCH3:	„Notch homolog 3”
NSD:	„nuclear SET domain”

PBS:	„phosphate buffer saline“
PcG:	„Polycomb group”
PCR:	polimeráz láncreakció
PRC:	„Polycomb repressor complex”
PTK9:	Protein tirozin kináz 9
q-RT-PCR:	kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció
RISC:	RNS indukált csendesítő komplex („RNS induced silencing complex”)
RNS:	ribonukleinsav
RT:	reverz transzkripció
SAP:	Shrimp alkalikus foszfátáz
SMARCB1:	„SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1”
SNF5:	„Sucrose Non-Fermenting gene number 5”
SUZ12:	„suppressor of zeste 12”
TAE:	Tris-acetát-EDTA
TE:	Tris-EDTA
U:	„unit” (nemzetközi egység)
UTR:	fehérjére át nem fordítódó mRNS szakasz, („untranslated region”)
WHO:	„World Health Organization” (Egészségügyi Világszervezet)

### 3. BEVEZETÉS

#### 3. 1. Az epithelioid sarcoma

Az Enzinger által 1970-ben azonosított epithelioid sarcoma [1] egy ismeretlen patogenezisű, jellegzetes, de ritka malignus lágyrész daganat, mely a sarcomák mintegy 0,6-1%-át [2], a gyermekkori nem rhabdomiosarcomatózus lágyrész sarcomák 4-8%-át [3] képezi napjainkban. A tumor két klinikopatológiai altípusát ismerjük, a klasszikus vagy disztális típust és a proximális (nagysejtes) variánst. A disztális altípus incidenciája körülbelül kétszer nagyobb a proximális típusénál [4]. Az elváltozás előfordulása altípustól függetlenül a férfiak körében közel kétszer gyakoribbnak számít, mint a nők körében [5]. A klasszikus típus az esetek több mint 70%-ában a 10 és 40 év (átlag 25,5 év) közötti korosztályt érinti [5]. A proximális variáns valamivel idősebb populációra jellemző, az érintett betegek több mint 80%-a 20 és 65 év (átlag 40 év) közötti kormegoszlású [6].

A klasszikus típusú epithelioid sarcoma főként a felső végtagok disztális részein fordul elő, az esetek több mint 60%-a az ujjakban és a kézben, ezt követik az alsó végtagi disztális és proximális, a felső végtagi proximális, végül a törzsi, feji és nyaki elhelyezkedések [7, 8]. A proximális típus leginkább a törzsi részek mélyebb lágyrész szöveteiben és a csípő/far tájékon jelenik meg, kisebb részben a combra, a fej és nyak régióra, a hónaljra és a végtagokra lokalizálódik [7, 8]. A felületi elhelyezkedésű lézióik szoliter vagy multiplex, lassan növekvő, rendszerint fájdalommentes és kemény csomókként ismeretesek. Az elváltozások gyakran nehezen gyógyuló bőr fekélyre emlékeztetnek. A mélyebb szövetekben előforduló típusok rendszerint nagyobb méretűek és infiltrálóbb tulajdonságúak [6].

Az ötéves betegségmentes túlélési arány 60-80% közé, a tízéves pedig 42-62% közé esik a nagyobb beteganyagokat tartalmazó vizsgálatok alapján [9, 10]. Metasztázisok a betegek mintegy 40-50%-ában alakulnak ki, rendszerint a tumorok ismételt kiújulásait követően és az áttétek leggyakrabban a tüdőt, valamint a regionális nyirokcsomókat érintik [11]. A tumor ötéves lokális kiújulásának rátája 35%-ra tehető [10]. Mindkét altípus esetén rossz prognosztikai faktornak számít a férfi nem, az előrehaladott kor, a proximális/axiális lokalizáció, az 5 cm-nél nagyobb tumorméret, a



magas mitotikus aktivitás, a nyirokcsomói érintettség, a proximális szöveti altípus rhabdoid morfológiával és a kiterjedt nekrozisok jelenléte [12]. A proximális típusú epithelioid sarcoma prognózisa szignifikánsan kedvezőtlenebb, mint a disztális típusé [3], viszont sokkal jobb, összehasonlítva a malignus rhabdoid tumor kimenetelével [12].

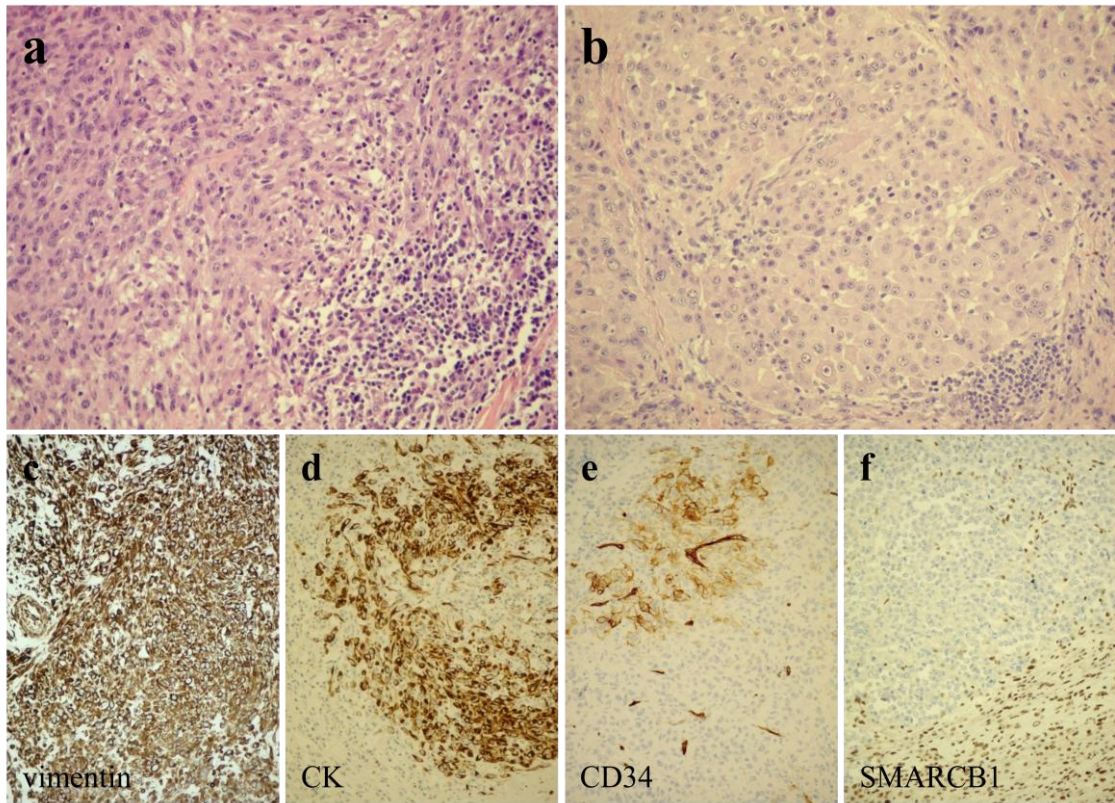
A tumorok széles sebészi eltávolítása a legelső és leginkább alkalmazott kezelési mód, de számos esetben használnak magas dózisú kemoradioterápiát [13, 14]. Azonban egy 11 beteget magába foglaló tanulmányban azt közölték, hogy sem a doxorubicin alapú kemoterápia, sem a sugárkezelés nem javította a tünetmentes túlélést [15]. Ugyanebben a tanulmányban javasolják a szerzők, hogy a betegek túlélését és életminőségét hatékonyan segítő kezelési stratégiák meghatározásához nagyobb szintű intézményi kollaborációk szükségesek a jövőben.

Az epithelioid sarcoma sejtekre a multidirekcionális, de legfőképpen az epitheliális differenciáció jellemző. A disztális altípus (1a. ábra) legtöbbször centrális nekrozis körül, szinte néha granulómát utánzó viszonylag monomorph daganatsejtekből épül fel, relatíve alacsony mitotikus aktivitás és a daganatsejteket övező lymphoid sejtes beszűrődés jellemzi. Ezzel szemben az elsőként 1997-ben leírt proximális típusú epithelioid sarcoma (1b. ábra) [16] gyakrabban mutat rhabdoid morfológiát, azaz a sejtek széles citoplazmával rendelkeznek, a magok excentrikus elhelyezkedésűek, prominens nukleóluszok láthatók és magasabb a tumor mitotikus aktivitása [17] is. Ezen utóbbi típus akár éretlen laphámrákra vagy angiosarcomára is emlékeztethet. A rhabdoid morfológia [18] a rendkívül magas malignus potenciálú rosszindulatú, akár mezenchimális vagy epitheliális daganatok indikátorának tekinthető. Számos tanulmány rámutatott a rossz prognózis és a rhabdoid sajátosság közti összefüggésekre [19-23]. A jól elkülöníthető rhabdoid jellegű sejt (2. ábra) excentrikus sejtmaggal, szembetűnő nukleusszal rendelkezik, eozinofil citoplazmájában gömbszerű, pericentrikusan elhelyezkedő, citokeratin és vimentin intermedier filamentumokból felépülő inklúziós test (zárványtest) található [24]. Főként a proximális típusú epithelioid sarcoma elkülönítése okoz nehézséget más gyengén differenciált carcinomától és epithelioid malignus tumoroktól [13].

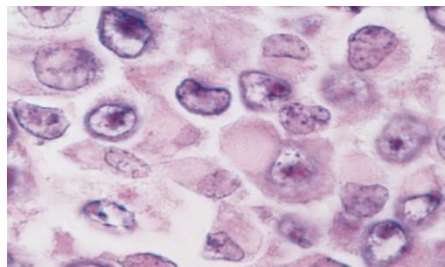
Az epithelioid sarcoma immunfenotípusát jellegzetes vimentin és epitheliális markerek: alacsony és magas molekulásúlyú citokeratinok, keratin 8, keratin 19 [21] és EMA [11] expressziója jellemzi (1c. és 1d. ábra). A carcinomákkal ellentétben az

epithelioid sarcomák mintegy 50%-a mutat CD34 immunpozitivitást (1e. ábra) [25]. Számos tanulmányban kimutatták a SMARCB1 nukleáris fehérje expressziójának hiányát az epithelioid sarcomák körülbelül 90%-ában (1f. ábra) [26, 27]. Az S100, desmin és FLI-1 immunhisztokémiai festések rendszerint negatívak bennük [28].

Bár a primer és metasztatizáló epithelioid sarcomán végzett citogenetikai vizsgálatok komplex eltéréseket találtak, különösen a 22q11 kromoszóma régióinak tulajdonítottak szerepet a tumor patogenezisében [29]. A 22q abnormalitások érintettségét a heterozigótaság veszteses kísérletek is feltételezték [30]. A 22q11-12 régiót érintő genetikai változások a *SMARCB1* tumorszupresszor gén mutációit, delécióit vagy más eltéréseit foglalták magukba. Ezeket a genetikai eltéréseket a gyerekkori vese és központi idegrendszeri rhabdoid tumorokban szintén megfigyelték [31]. Bár *SMARCB1* inaktivációt az epithelioid sarcomák többségében [32] és a malignus rhabdoid tumorokban egyaránt leírtak, előbbieken a *SMARCB1* mutációk gyakorisága szignifikánsan alacsonyabbnak adódott [26, 27]. Mindez azt sugallja, hogy a SMARCB1 fehérje expresszió hiányáért felelős mechanizmusok eltérőek lehetnek a két említett entitásban.



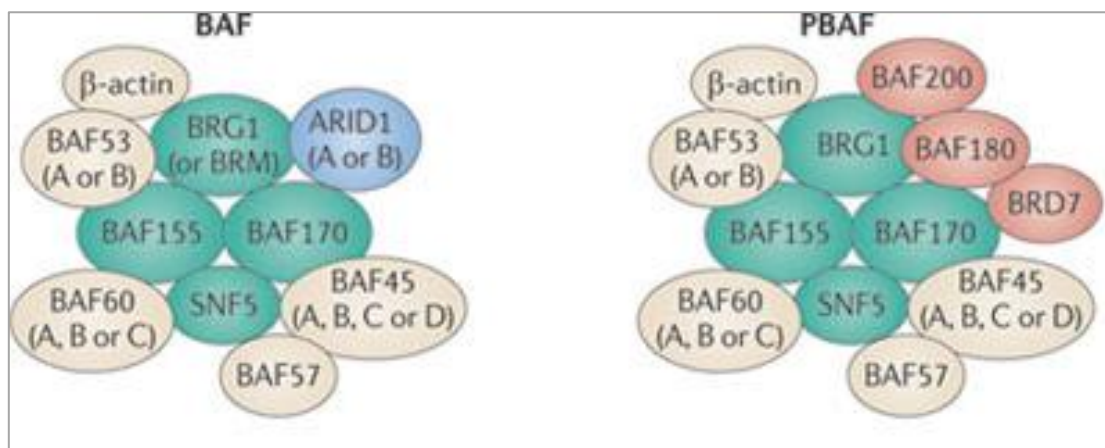
**1. Ábra:** Disztális (a; 20x nagyítás) és proximális (b; 20x nagyítás) típusú epithelioid sarcoma H&E (hematoxilin-eozin) festett képe. A tumorsejtek jellegzetes vimentin (c; 20x nagyítás), citokeratin (d; 20x nagyítás) és CD34 (e; 20x nagyítás) pozitivitása, valamint SMARCB1 (f; 20x nagyítás) negativitása immunhisztokémiai reakciókkal kimutatva.



**2. Ábra:** Jellegzetes rhabdoid sejtek H&E festett morfológiai képe (100x nagyítás)

### 3. 2. A SWI/SNF kromatin-átrendező komplex

A DNS nukleoszómákba való szerveződése, tehát maga a kromatin szerkezet gátolja a génkifejeződést azzal, hogy a transzkripciós faktorok, az aktivátorok és az RNS polimeráz nem fér hozzá a DNS-hez. A transzkripció előfeltétele a kromatin fellazulása. A génexpressziót befolyásoló kromatin változások lehetnek: kromatin-átépítés (chromatin-remodeling), hisztonok módosulása vagy DNS metiláció. Ezidáig összesen öt ATP függő kromatin-átépítő komplexet ismerünk: SWI/SNF, ISWI, NuRD, INO80 és SWR1. Ez egy új és összetett területe a biológiának, a legtöbb információval talán a SWI/SNF kromatin-átépítő komplexekről rendelkezünk. Eme komplexek az összes eukarióta szervezetben megtalálhatók és nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak. A SWI/SNF fehérje komplexek felépítését a 3. ábra mutatja be. A fehérje komplex ATP energiájának felhasználásával képes a nukleoszómákat áthelyezni és ezzel pl. a promótert hozzáférhetővé tenni [33, 34]. Ennek a dinamikus folyamatnak jelentős szerepe van a sejtek differenciációjában és jelátviteli útvonalában, valamint specifikus target gének transzkripciójának szabályozásában [35].



**3. Ábra:** Az SWI/SNF komplexek felépítése. Evolúciósan konzervált központi alegységekből (zöld) és variábilis alegységekből (sárga) állnak. A BRG1-asszociált faktor (BAF) és a polybromo BRG1-asszociált faktor (PBAF) komplexek képezik a legfőbb alosztályait. Az AT-gazdag interaktív domént tartalmazó protein 1A (ARID1A) és az ARID1B (kék) a BAF komplexhez társultak, míg BAF200, BAF180, valamint bromodomain tartalmú protein 7 (BRD7) (piros) a PBAF komplexben egyediek.

A SWI/SNF komplexek számos variánsa ismert emlősökben, megkülönböztetésük szövet specifikus alegységeiknek megfelelően lehetséges. (1. táblázat) Az emlős SWI/SNF komplex az élesztővel homológ SWI2/SNF2 ATPáz fehérje családból (vagy SMARCA4/BRG1 vagy SMARCA2/BRM), SMARCB1, SMARCC1/BAF155 és SMARCC2/BAF170 központi alegységekből, valamint 4-8 szöveti származás alapján különböző további alegységből épül fel [36, 37]. A SMARCB1 az összes SWI/SNF variánsban központi alegységként szerepel. A fehérje szintúgy magasan konzervált, amint azt egér és humán aminosav szekvenciák mutatják.

**1. Táblázat:** SWI/SNF komponensek élesztőben, ecetmuslicában és emlősökben

<i>Emlős SWI/SNF alegységek</i>		<i>Nem-gerinces ortológok</i>	
<i>Alegység neve</i>	<i>Gén neve</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Drosophila</i>
BAF250A	<i>ARID1A</i>	SWI1	OSA
BAF250B	<i>ARID1B</i>		
BAF200	<i>ARID2</i>		BAP170
BRM	<i>SMARCA2</i>	SWI2/SNF2	BRM
BRG1	<i>SMARCA4</i>	SWI2/SNF2	BRM
BAF180	<i>PBRM1</i>	RSC1	Moira/BAP155
BAF170	<i>SMARCC2</i>	SWI3	Moira/BAP155
BAF155	<i>SMARCC1</i>	SNF12	BAP60
BAF60A	<i>SMARCD1</i>	SNF12	BAP60
BAF60B	<i>SMARCD2</i>	SNF12	BAP60
BAF60C	<i>SMARCD3</i>		
BAF57	<i>SMARCE1</i>		Dalao/BAP111
BAF53A	<i>ACTL6A</i>		BAP55
BAF53B	<i>ACTL6B</i>	ARP4	
BAF47	<i>SMARCB1</i>	SNF5	SNR1

### 3. 3. A *SMARCB1* gén

#### 3. 3.1. Nevezéktan

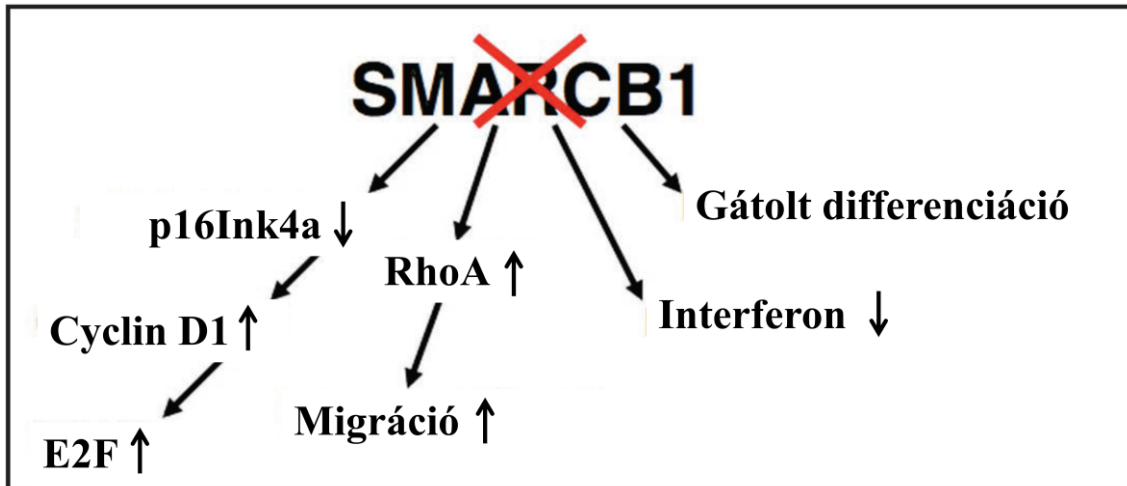
A gén ortológját először mutáns élesztő szervezetek szacharóz fermentációra képtelen változataiban vizsgálták [38]. Ezáltal kapta a gén a *Sucrose Non-Fermenting gene number 5 (SNF5)* nevet, majd megállapították róla, hogy átírt fehérjéje a SWI/SNF

kromatin-átrendező komplex tagja [39]. A humán ortológot a humán immundeficiencia vírus integráz fehérjével kölcsönható proteinként azonosították, így nevezték el INtegrase Interactor 1-nek (INI1) [40]. Feltételezték, hogy az emlős SWI/SNF komplex szerepe valamennyiben eltér az élesztőben leírt funkcióktól, ezért a Brg1/Brm Associated Factors complex (BAF komplex) névváltoztatást javasolták. Majd a 47 kDa-os molekula tömege miatt nevezték el BAF47-nek. A HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) 2002-es évi szabályzata [41] alapján a gén megnevezésére elfogadott szimbólum a funkcionális szerepre utaló *SMARCB1* („*SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily B, member 1*”) lett, mely név alapján a fehérje a SWI/SNF ATP-függő kromatin-átrendező komplex központi alegységeként működik [42].

### 3. 3.2. A *SMARCB1* gén funkciói

Korábban megjelent tanulmányok kimutatták, hogy a *SMARCB1* gén a genom stabilitásának ellenőrzésében és a sejtciklus progressziójának szabályozásában vesz részt [43]. A *SMARCB1* serkenti a p16/Rb tumorszupresszor útvonalat, azáltal hogy aktiválja a CDKN2A-t és gátolja a CDK / ciklin D komplexet [44]. A *SMARCB1* kiesés a sejtciklus progresszióját okozza részben a p16<sup>INK4a</sup> leszabályozásával és az E2F és ciklin D1 felülszabályozásával (4. ábra) [45-48]. Bár a *SMARCB1* vesztés kiváltotta abnormális proliferációs stimulus is serkenti a sejtciklus ellenőrző pontjait, ezáltal nyugalmi állapotot és apoptózist indukál. Így annak ellenére, hogy felülszabályozódnak a proliferációhoz asszociált útvonalak, a *SMARCB1* biállélikus kiesése a primer sejtekben letálisnak bizonyul. Továbbá a *SMARCB1* hiányos sejtek túlérzékenységet mutatnak a genotoxikus stresszre, emelkedett számú aberráns mitózissal bírnak és felhalmozzák a foszforilált p53-at. Mindez specifikus p53 target gének emelkedett expresszióját eredményezi utalva a *SMARCB1* szerepére a DNS károsodásokra adott válaszban [49]. A *SMARCB1* szerepét kimutatták az aktin citoszkeleton hálózat szabályozásában, továbbá azt találták, hogy vesztése aktiválja a RhoA jelutat és fokozott migrációval jár [50, 51]. Ezenfelül rhabdoid sejtvonalakban a *SMARCB1*

hiánya megakadályozta az interferon stimulálta gének aktivációját, ami az interferon kezelés lehetőségét vetheti fel [52] (4. ábra).



4. Ábra: A SMARCB1 vesztes tumor-asszociált hatásai

### 3. 3.3. SMARCB1 deficiens tumorok

A *SMARCB1* gén a 22q11.23 kromoszóma régióban helyezkedik el, és mint szupresszor gén vált ismertté malignus rhabdoid tumorokban (MRT) [53, 54]. Az MRT egy nagyon agresszív neoplázia gyermekek veséjében, extra-renális lágyrészeiben és agyszövetében. Ebben a daganattípusban a *SMARCB1* gén mindkét allélját érintő, ún. biallélikus génkárosodás azonosítható, ami arra utal, hogy a tumorszupresszor funkcióvesztő mutációja hozzájárul a tumor onkogeneziséhez [53]. Azonban úgy tűnik, hogy a *SMARCB1* gén további tumortípusok patogenezisében szerepet játszik. Az epithelioid sarcoma, a vese medulláris carcinoma, az epithelioid malignus idegsejt tumor, a mioepitheliális carcinoma és az extraszkeletális mixoid chondrosarcoma jelentik a daganatok azon csoportjait, melyek *SMARCB1* aberrációkon osztoznak [55]. Az előzőleg említett entitások mindegyike mutathatja a *SMARCB1* expresszió hiányát, jellemzőik lehetnek a rhabdoid citomorfológia és a néha átfedő immunhisztokémiai és szövettani tulajdonságok.

### 3. 4. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok

A genom a bázisok sorrendje által meghatározott genetikai információ mellett poszt-szintetikus módosításoknak köszönhető ún. epigenetikai többletinformációt is tartalmaz. Mindez a genetikai információ megfelelő helyen és időben történő hasznosításának koordinációját teszi lehetővé. Az epigenetikai információ elsősorban a gének expressziójának szabályozásában játszik szerepet. Fontosságát leírták az embriogenezis és a szöveti differenciálódás szabályozásában [56, 57], a kromoszómák megfelelő szerkezetének kialakításában [58], az X kromoszóma inaktiválásában [59] és a genomikus bevésődés (imprinting) kialakításában [60]. Ezeken felül az epigenetika fontos szerepet tölt be a tumorképzésben is [61, 62].

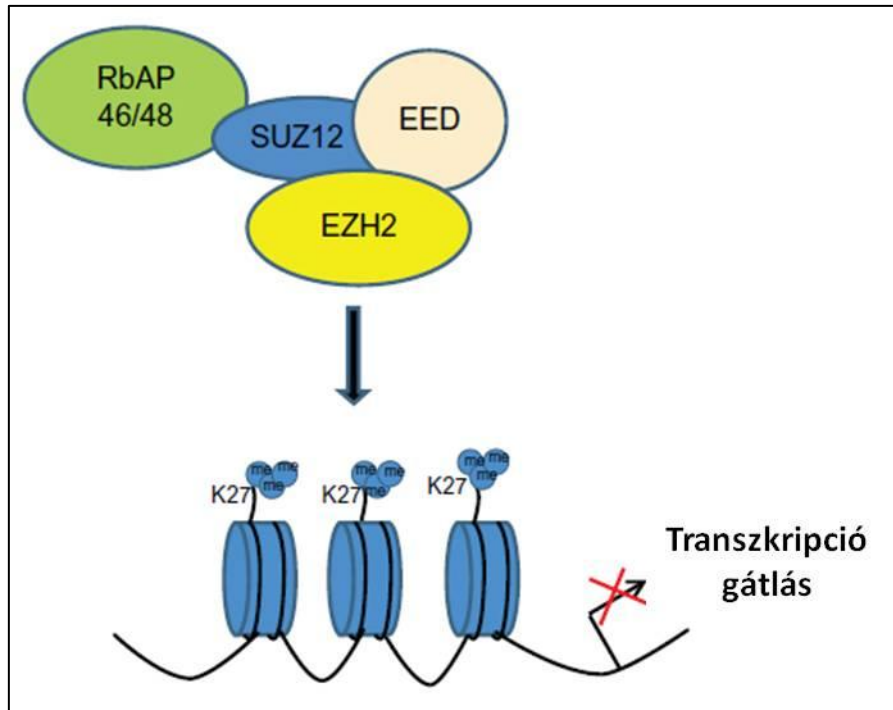
Az epigenetikai szabályozás a DNS metilációján vagy a különböző hiszton modifikációkon (acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció, stb.) keresztül valósulhat meg. A géncsendesítésben szerepet játszó Polycomb represszor fehérje komplexek [63, 64], valamint a microRNS-ek (miRNS) [65] is az epigenetikai szabályozás részének tekinthetők.

#### 3. 4.1. Hiszton metiláció

A génkifejeződés epigenetikai szabályozásának egyik mechanizmusa a hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosítása. A módosítások lehetnek acetilációk, metilációk, foszforilációk, ubikvitinációk, sumoylációk, stb. [66]. Ezek közül a metiláció és az acetiláció a leggyakrabban tanulmányozott hisztonmodifikációs mechanizmus. A hiszton fehérjék acetilációja eltávolítja a pozitív töltéseket, ami által csökken a hiszton DNS-hez való affinitása, s így az RNS polimeráz és a transzkripciós faktorok könnyebben hozzáférnek a DNS szabályozó régióihoz, ami megnöveli az érintett génekről történő transzkripció végbemenetelének esélyét. A hisztonok metilációjához metil gyök (-CH<sub>3</sub>) hozzáadása az acetilációval rendszerint ellenkező hatású. A metilált hisztonok általában (nem mindig) erősebben kötődnek a DNS-hez. A metiláció célpontja a hisztonok N-terminálisán elhelyezkedő bázikus lizin, arginin és hisztidin



aminosavak. A metiláció eredményeként az aminosavak 1, 2 vagy 3 H atomja metilgyökre cserélődik, s így metil-lizin (me1), dimetil-lizin (me2) vagy trimetil-lizin (me3) molekulákat kapunk. A metiláció nem a hiszton töltését befolyásolja, hanem megváltoztatja a hisztonok egymással és a szabályozó fehérjékkel való kapcsolatát. A metiláció rendszerint erősíti a hiszton-DNS kapcsolódást, s így csökkenti (meg is szüntetheti) egy DNS szegmens transzkripció aktivitását. A legszélesebb körben tanulmányozott hiszton metilációs helyek a H3 lizin4 (H3K4; a H3 hiszton alegység 4. pozíciójában lévő lizin), a H3K9, a H3K27, a H3K36, a H3K79 és a H4K20. A metil-lizin molekula jellege, mintázata és a metiláció foka (me1, me2 vagy me3) különböző génextpressziós állapotokkal hozható összefüggésbe. Például a H3K4me3 általában aktív transzkripciót eredményez [67], míg H3K27me3 negatívan szabályozza a génextpressziót, mivel a kompakt kromatin állomány létrejöttét segíti elő. A metilációt specifikus hiszton-metiltransferáz (HMT) enzimek végzik. Hasonlóan az acetilációhoz, a metiláció is reverzibilis, a CH<sub>3</sub> gyökök eltávolítását a hiszton farkak lizin és arginin aminosavairól a különféle hiszton demetiláz enzimek hajtják végre. Számos bizonyíték utal arra, hogy az aberráns hiszton metilációnak szerepe lehet a daganatképződésben. A hiszton metilációt módosító és a metilkötő fehérjék mutációi vagy kifejeződésük változásai korrelációt mutatnak a különböző daganatos megbetegedések növekvő incidenciájával [68, 69]. Például a H3K27me3 metiltransferáz EZH2 (Enhancer of zeste homologue 2) felülszabályozódik számos tumor például prosztatata [70], emlőrák [71], limfóma [72] és egyes lágyrész sarcomák, pl. synovialis sarcoma [73] esetében is. Az EZH2 overexpressziója korrelációt mutat az előrehaladott daganatos progresszióval, a tumor agresszív viselkedésével és előnytelen klinikai kimenetelével [74]. Az EZH2 a Polycomb fehérje család (PcG-polycomb group) tagja, mely fehérjék a transzkripció gátlás epigenetikai szabályozói (5. ábra) és a sejtciklus regulációjában, a DNS károsodások kijavításában, a sejtek differenciálódásában, szenescenciájában és apoptózisában vesznek részt. A PcG fehérje család tagjai két, ún. multimer polycomb represszor komplexet (PRC-Polycomb Repressive Complex), a PRC1-et és a PRC2-t alkotják. Az EZH2 az EED (embryonic ectoderm development) és a SUZ12 (suppressor of zeste 12) alegységekkel funkcionális kölcsönhatásban szerepelve adják a PRC2 központi tagjait és katalitikus alegységeit (5. ábra).



**5. Ábra:** Az EZH2 által közvetített hiszton metiláció és transzkripció gátlás. A PRC2 komplex alegységeként az EZH2 az EED és SUZ12 fehérjékkel interakcióba lépve képes a hisztonok lizin oldaláncaára metil csoportokat kötni, ezáltal a génkifejeződést szabályozni.

### 3. 4.2. DNS metiláció

Nem csupán a hisztonok, hanem a DNS is metilálódhat, melynek funkciója a kompakt kromoszómaszerkezet kialakítása és a transzkripció gátlása. Magasabb rendű eukariótákban metilált lehet a DNS CG dinukleotidban gazdag régiójában elhelyezkedő citozin pirimidinyűrűjének 5. szénatomja. Ennek a módosulásnak fontos szerepe van a gének expressziójában, különösen, ha egy génben CpG-gazdag régió (CpG sziget; a „p” azt jelzi, hogy a két nukleotid foszfodiészter kötéssel kapcsolódik egymáshoz) található. Ezek gyakran a gént szabályozó, ún. promóter régiójában találhatók. Normál, nem malignusan transzformált sejtekben a legtöbb CpG sziget nem metilált állapotban fordul elő [75]. Egy normálisan nem metilált CpG sziget kóros metilációja megakadályozza a gén transzkripcióját, amely nem ritka jelenség daganatos sejtekben. Ez a mechanizmus

tumorszupresszor gének inaktiváló mutációjával ekvivalens funkcióvesztést eredményez [75, 76]. A különbözőféle sarcomák esetében ismert már, hogy megnövekedhet bennünk bizonyos promóterek metilációja. Például, egy vizsgálat mintegy 98 tumor több mint 1000 CpG szigetének tanulmányozásával felfedte, hogy néhány malignus daganat (mell, fej és nyak, here) esetében alacsony szintű a metiláció, míg mások, köztük 22 primitív neuroektodermális tumor nagy frekvenciájú metilációt mutatott [77]. Továbbá számos sarcoma sejtvonalban és primer tumorban azonosítottak túlzott mértékben metilált, specifikus géneket, beleértve a kulcsfontosságú sejtciklus szabályzó *CDKN2A* gént és másokat [78, 79]. Mixoid/kereksejtes liposarcomában például kimutatták a fontos tumorszupresszorként ismert *APC* gén promóterének magas frekvenciájú CpG-metilációját [80].

### 3. 4.3. A mikroRNS-ek (miRNS-ek) mint poszttranszkripcionális szabályozó molekulák

#### 3. 4.3.1. A miRNS-ek jellemzői és képződésük folyamata

A miRNS-ek rövid, 16-29 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló, egyszálú ribonukleinsav (RNS) molekulák, amelyek az ún. RNS-interferencia endogén mediátorai. Irodalmi adatok szerint a humán génátíratok mintegy 30-50%-át szabályozzák [81, 82]. A miRNS-ek speciális érési útvonalon keresztül nyерik el az effektor formájukat: pri-, pre-miRNS formán át különböző enzim-komplexek hasításának segítségével duplaszálú, érett miRNS-ekké alakulnak [83]. A származásuk szerint keletkezhetnek egyedi génekről (ún. intergénikus miRNS-ek) vagy származhatnak intronikus régiókból is [84]. Attól függően, hogy egy átírási egységbe hány miRNS tartozik, klasztereket különböztethetünk meg [85], pl.: miR-17-92-es klaszter, melynek érett miRNS-ei központi jelentőséget töltenek be az apoptotikus folyamatok szabályozásában [86]. A miRNS génekről az RNS polimeráz II (pol II) a sejtmagban egy elsődleges vagy más néven primer (ún. pri-miRNS) transzkriptumot ír át, mely a termodinamikai összefüggéseknek megfelelő, részleges kettőszálú

térszerkezetet vesz fel. Ennek hatására hajtú régiók alakulnak ki, melyekről az érett miRNS-ek létrejöhetnek. A képződő duplaszálú prekursor (ún. pre-miRNS) alakot egy Drosha nevű RNáz III típusú enzim hasítja le a primer formáról. Az enzim általi felismerés és levágás szigorúan meghatározott szabályok szerint történik, azonban a részletek máig nem tisztázottak teljesen. A következő lépésben az állati sejtek esetében a sejtmagból a citoplazmába kerül a hurkos, kétszálú pre-miRNS egy membránfehérje, az Exportin-5 segítségével. A növényi sejtekben ezzel szemben ez még a sejtmagi folyamat része. A citoplazmába került duplaszálú, hurkos forma ezután hasításon megy keresztül, melyet egy RNáz III típusú enzim, a Dicer végez el. A kétszálú, 22-23 nukleotid hosszúságú termék a következő lépésben egy helikáz enzim segítségével egyszálúvá alakul, így beépülve egy fehérje komplexbe, a RISC-be [mely az RNS indukálta csendesítő komplex („RNA induced silencing complex”) kifejezésből származik], és az mRNS-ek repressziójában vagy azok hasításában vesz részt [87].

### 3. 4.3.2. A miRNS-ek nevezéktana

A szekvenciájukban különböző, érett miRNS-eket a "miR-" előtag után feltüntetett sorszámmal különítjük el egymástól. A miR előtt feltüntetett "hsa-" előtag a miRNS humán eredetére utal. Előfordulhat, hogy ugyanazon miRNS-t egy fajon belül a genom különböző lókuszaiban elhelyezkedő több gén is kódol, és ezeket a miRNS sorszáma után kötőjellel feltüntetett újabb számmal különítik el (pl. miR-6-1, miR-6-2). Az egy-két nukleotidban különböző miRNS variánsokat betűjellel különítik el (pl.: miR-181a, miR-181b). Az is előfordul, hogy egyes miRNS prekursorok mindkét száláról érett miRNS képződik. Amennyiben az egyik karról szintetizált miRNS túlsúlyban van, a kevésbé domináns miRNS-t csillaggal jelölik (pl.: miR-129, miR-129\*). Egy adott prekursor 5' karjáról keletkező miRNS-t a miRNS sorszáma utáni -5p, míg a 3' végről képződő miRNS esetén a -3p megjelölést alkalmazzák (pl.: miR-485-5p, miR-485-3p) [88, 89].

### 3. 4.3.3. A miRNS-ek szerepe a daganatképződésben

A miRNS-ek tumorszupresszorok és protoonkogének poszt-transzkripció gátlásán keresztül szabályozzák a jelátvitel és a sejtciklus folyamatait. Ebből következik, hogy expressziójuk változása a sejtosztódás egyensúlyának felborulásához, fokozott sejtproliferációhoz és daganatképződéshez vezet. A miRNS-ek tumorigenezisben betöltött szerepére utal az is, hogy az ezeket kódoló gének több mint fele, olyan sérülékeny kromoszóma régiókban található, amelyek aberrációja gyakran megfigyelhető daganatokban. Az utóbbi években a tumorbiológiai kutatások egyre nagyobb hangsúlyt fektettek a különböző daganattípusok miRNS expresszió alapján történő osztályozására. Az mRNS expressziós mintázat alapján történő vizsgálatokkal szemben a miRNS-ek előnye, hogy mivel egy miRNS molekula egyszerre több száz cél mRNS expresszióját szabályozhatja, így már jóval kisebb számú miRNS marker is elegendő jól elkülöníthető csoportok felállításához [90, 91].

A miRNS-ek patogenetikai szerepét elsőként B-sejtes krónikus lymphoid leukémia esetén igazolták [92]. Ezt követően azonban számos daganattípusban írtak le szignifikánsan megváltozó miRNS expressziós mintázatot, többek közt pancreas [93], pajzsmirigy [94], tüdő [95], máj [96], gyomor [97], petefészek [98] és különböző idegrendszeri daganatok (glioblastoma multiforme, neuroblastoma) esetében is [99]. Daganatokban az ép szövethez képest változást mutató expressziójú miRNS-ek a klasszikus onkogén-tumorszupresszor vonal alapján osztályozhatók. Azaz a tumorszövetben fokozott expressziót mutató miRNS-ek onkogén (onkomiR), míg a represszáltak tumorszupresszor tulajdonságúak. Mivel az *in silico* becslések alapján a miRNS-ek egyszerre akár több száz protoonkogén és tumorszupresszor tulajdonságú célmolekulát is szabályozhatnak, így daganatképzésben betöltött szerepük tisztázásához elengedhetetlen célpontjaik és azok biológiai funkciójának azonosítása is.

Mindez arra utal, hogy a miRNS-ek expressziós mintázatának tanulmányozása különböző tumorok esetében több szempontból is nagy jelentőségű. Egyrészt közelebb vihet a daganatok patogenezisének pontosabb megértéséhez, másrészt segítségével olyan biomarkerek azonosíthatók, melyek alkalmazása nagymértékben megkönnyíti a tumorok pontos diagnosztizálását. Ilyen biomarkereket alkalmaznak többek közt a follicularis pajzsmirigy-tumorok esetében is. Ezek kórszövettani elkülönítése rendkívül

nagy gyakorlatot igényel, kétes esetekben azonban néhány miRNS marker (miR-197, miR-221, miR-346) expressziójának vizsgálata segítheti a diagnózist, illetve a későbbi terápia megválasztását [100]. A miR-221 expressziójának változása azonban nem csak tumoros szövetekben, hanem a környező, szövettanilag még ép területeken is megfigyelhető. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a miRNS expresszió megváltozása a tumorképződés kezdeti jele, így segítségével a betegség már korai stádiumban is felismerhető. A miRNS expresszió vizsgálata a prognózis megállapításának szempontjából is jelentőséggel bír, mivel egyes daganatok esetében a tumor agresszivitása, az áttétképződés és a betegek túlélési ideje mind előrejelezhetőek a miRNS profil alapján [101]. Végül, de nem utolsó sorban a változást mutató miRNS-ek és az általuk szabályozott gének a jövőben a daganatterápia új célpontjait is jelenthetik.

## 4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az epithelioid sarcoma kialakulásában szerepet játszó genetikai és epigenetikai tényezők vizsgálatát tűztük ki célul. Azt szerettük volna megállapítani, vajon milyen biológiai mechanizmus állhat a *SMARCB1* tumorszupresszor gén expressziójának eltűnése mögött ebben a daganat típusban.

Főbb kérdéseink, feltételezéseink a következők voltak:

1. A *SMARCB1* gén mutációs státuszának feltárásával arra kerestük a választ, vajon genetikai károsodások (kromoszóma deléciók, exon deléciók, intraexonikus aberrációk) tehetők-e felelőssé a gén funkciójának hiányáért epithelioid sarcomában.
2. Feltételeztük, hogy a *SMARCB1* gén promóterében lévő CpG szigetek hipermetilációja okozhatja a génexpresszió tapasztalt gátlását.
3. Az EZH2 mediálta hiszton metiláció esetleges szerepét az EZH2 és a H3K27me3 epigenetikai marker fehérje expressziójának meghatározásával kívántuk vizsgálni.
4. Feltételeztük, hogy miRNS-ek mint poszt-transzkripciós szabályozók felelősek a *SMARCB1* gén csendesítéséért. Ennek kiderítéséhez célul tűztük ki a gén 3'UTR-jét potenciálisan felismerő miRNS-ek azonosítását bioinformatikai módszerekkel. A lehetséges patogenetikai szereppel bíró miRNS-eket miRNS-expressziós vizsgálatokkal kívántuk identifikálni. Az emelkedett expressziót mutató miRNS-ek funkcionális hatását *in vitro* szövettenyészeteken kívántuk vizsgálni.

## 5. MÓDSZEREK

### 5. 1. Vegyszerek, oldatok, pufferek

A különböző laboratóriumi vegyszereket (pl. Xilol, Etanol, stb) a MOLAR Chemicals Kft-től szereztük be. Minden a vizsgálatokban használt reagens molekuláris biológiai tisztaságú volt. A vizsgálatok során használt oldatok, pufferek elkészítéséhez és azok hígításaihoz háromszor desztillált (Millipore Co.), autoklávozott vizet használtunk.

A szövettényészeti tápfolyadékok a foetalis marhaszérum (FBS) és egyéb szövettényészeti anyagok, mint antibiotikumok, tripszin-EDTA oldat (0,5 g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA) a Sigma (St. Louis, MO, USA) és a Gibco BRL (Eggenstein, Németország) termékei voltak.

A szövegben részletesen nem specifikált oldatok és pufferek összetétele:

**citrát:** 10x-es (pH=6): 29,41g  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$

**SSC:** 20x-os (pH=7): 175,3g NaCl; 88,2g  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$

**TAE:** 10x-es (pH=8,0): 0,4M Tris-HCl, 0,02M EDTA, 11,4ml/l ecetsav

**TE:** 1x-es (pH=8,0): 10mM Tris, 1mM EDTA

### 5. 2. Szövetminták

Vizsgálatainkhoz összesen 36 epithelioid sarcomában szenvedő beteg formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintáját használtuk, melyből 17-et a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben, hatot az Országos Onkológiai Intézetben, kilencet a chicagói Egyetem Orvosi Központjában, hármat a rochesteri Mayo Klinika Patológiai Intézetében és egyet pedig a texasi Scott & White Egészségügyi Központban diagnosztizáltak és archiváltak. A diagnózisok a WHO (World Health Organization) kritériumainak megfelelően, hisztopatológiai és



immunfenotípus vizsgálatok alapján történtek. A vizsgált betegek klinikai adatai és immunhisztokémiai eredményei (SMARCB1 és CD34) a 2. táblázatban láthatóak.

**2. Táblázat:** A betegek klinikai adatai, SMARCB1 és CD34 immunhisztokémiai eredményeik; ES: epithelioid sarcoma

Esetszám	Nem	Életkor	Lokalizáció	ES altípusa	SMARCB1	CD34
1	férfi	42	nyirokcsomó metasztázis	proximális	-	+
2	férfi	69	jobb oldali lágyék régió	proximális	-	-
3	nő	30	jobb kéz	proximális	-	-
4	férfi	84	bal comb	proximális	-	+
5	nő	62	nagy cseplesz	proximális	-	-
6	férfi	29	bal alsó vagtag	disztális	-	+
7	nő	49	bal alsó vagtag	disztális	-	-
8	nő	30	bal oldali lágyék régió	proximális	-	+
9	nő	36	jobb comb	disztális	-	+
10	nő	40	ízület	proximális	-	+
11	férfi	29	fejtető	disztális	-	-
12	férfi	34	jobb oldali lágyék régió	proximális	-	+
13	nő	70	hüvely	proximális	-	+
14	nő	87	jobb kéz	disztális	-	-
15	nő	50	gáttájék	proximális	-	+
16	nő	43	bal hüvelykujj	disztális	-	+
17	férfi	83	jobb gyűrűsujj	disztális	-	-
18	férfi	29	bal alkar	disztális	-	-
19	férfi	48	pleura metasztázis	proximális	-	+
20	férfi	23	jobb alkar	disztális	-	-
21	férfi	17	bal alkar	disztális	-	+
22	nő	18	jobb alkar	disztális	-	+
23	férfi	42	bal hüvelykujj	disztális	-	+
24	nő	12	jobb kéz	disztális	-	+
25	férfi	12	fejtető metasztázis	disztális	-	+
26	nő	23	nyirokcsomó metasztázis	disztális	-	+
27	férfi	31	nyirokcsomó metasztázis	disztális	-	-
28	férfi	25	bal alsó végtag	disztális	-	+
29	nő	82	bal comb	disztális	-	-
30	nő	68	szeméremtest	proximális	-	-
31	férfi	28	jobb oldali lágyék régió	proximális	-	+
32	férfi	48	nyirokcsomó metasztázis	proximális	+	+
33	férfi	63	csípő régió	proximális	+	+
34	férfi	34	nyirokcsomó metasztázis	proximális	+	+
35	férfi	63	orr	disztális	+	+
36	férfi	52	bal kar	disztális	+	+

A tanulmányunkban kontrollként szerepelt két malignus rhabdoid tumor minta a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből származott. A diagnózis ezekben az esetekben is a WHO kritériumainak megfelelően lett felállítva.

### 5. 3. Immunhisztokémia

A vizsgált FFPE szövetmintákból készült 2 µm vastagságú metszeteket 3 x 5 percig xilol oldatban, majd leszálló etanol sorban deparaffináltuk. Az immunhisztokémia módszer körülményeinek standardizálását Bond Max™ (Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság) típusú immunfestő automatával teremtettük meg. Az antigén feltáráshoz a gyártó (Leica Biosystems) által ajánlott pH=6-os vagy pH=9-es feltáró oldatokat használtuk, melyekben a metszeteket 100 °C-on 30 percig inkubáltuk. A felhasznált primer antitestek származási helye és alkalmazott hígítása a 3. táblázatban látható.

#### 3. Táblázat: A primer antitestek adatai

Primer antitest	Származási hely	Hígítás
monoklonális egér anti-BAF47 (SMARCB1; clone 25)	BD	1:50
monoklonális egér anti-citokeratin (clones AE1/AE3)	Dako	1:150
monoklonális egér anti-EMA (clone E29)	Dako	1:200
monoklonális egér anti-vimentin (clone V9)	Dako	1:600
monoklonális egér anti-CD34 classII (clone QBEnd10)	Dako	1:300
poliklonális nyúl anti-S100	Dako	1:1500
monoklonális egér anti-EZH2 (clone 11)	BD	1:25
monoklonális nyúl anti-H3K27me3 (C36B11)	Cell Signaling	1:200

A primer antitestekkel 25 percen át inkubáltunk, majd az immunreakciót a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB szubsztrát/chromogén kit (Leica Biosystems) segítségével hívtuk elő. Záró lépésként a sejtmagokat hematoxilinnal festettük. A SMARCB1 immunreakciók értékelése a sejtmagi expresszió megléte vagy hiánya alapján történt. Az EZH2 immunhisztokémia értékelését a Pacheo és mtsai. által leírt rendszer kismértékű módosításával végeztük el [102]. A sejtmagi reakciók intenzitásának meghatározása a következők szerint történt: nincs reakció= 0 pont, gyenge reakció= 1 pont, mérsékelt reakció= 2 pont, erős reakció= 3 pont. A pozitív reakció kiterjedésének elemzése a pozitív sejtek százalékos előfordulási arányán alapult: nincs reakció= 0 pont, 1-50% pozitív= 1 pont, 51-75% pozitív= 2 pont, >75% pozitív= 3 pont. Mindkét pontszám meghatározásához legalább 100 tumorsejtet számoltunk le. Ha a tumorsejtek több mint 30%-a erősebb magi

intenzitással rendelkezett, akkor a magasabb pontszámot használtuk. A két pontérték összege adta meg az adott minta végső pontszámát, ha ez az érték három felett volt, akkor az esetet EZH2 pozitívnak tekintettük.

#### 5. 4. Floureszcens *In Situ* Hibridizáció (FISH)

A vizsgált FFPE szövetmintákból készült 2 µm vastagságú metszeteket 3 x 5 percig xilol oldatban, majd leszálló etanol sorban deparaffináltuk. Desztillált vizes mosást követően a feltárást mikrohullámú sütőben, forrásban lévő citrát pufferben végeztük 25 percen át, majd a mintákat hagytuk kihűlni. Újra desztillált vizes mosás következett. A minták előkezelését 2x-es SSC/0,1%-os Igepal (NP-40) detergens (Kreatech, Amszterdam, Hollandia) oldatában folytattuk 37 °C-os vízfürdőben 15 percig inkubálva. Az emésztés pepszin oldatban (0,5 mg/ml; pH=1.0) 37 °C-os vízfürdőben 15 percen át zajlott. Desztillált vizes mosás után a mintákat felszálló etanol sorban (70%, 80%, 100%) dehidratáltuk. A BCR/ABL Dual Color Translocation Probe Set (Abbott Molecular, Illinois, USA) előírásának megfelelően 4,5 µl DNS próbát adtuk hozzá a megjelölt (karcolt) sejt dús területekhez, melyet 18 x 18 mm-es fedőlemezzel és Fixogum ragasztóval (Marabu Co., Bietigheim, Németország) hermetikusan fedtük. A tárgylemezeket ezután egy ThermoBrite Denaturation/Hybridization System gép (Abbott Molecular) feltétjére helyeztük a DNS próbák és a sejtek DNS-ének párhuzamos denaturálása céljából (5 perc, 73 °C), majd egy éjszakán át hibridizáltuk őket 37 °C-on. A fedőlemez eltávolítása után a lemezeket 2 percre 0,4x-es SSC/0,1%-os Igepal 73 °C-os oldatába, majd 2 percig 2x-es SSC/0,1%-os Igepal szobahőmérsékletű oldatába helyeztük. A készítményeket ezután szobahőmérsékleten, sötétben, levegőn szárítottuk, majd 10 µl Vectashieldben (a fluoreszcens festékek kiegészését gátló anyag) oldott DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories Burlingame, USA) rácsöppentése után fedőlemezzel fedtük. Az alkalmazott DNS próba BCR (SpectrumGreen-nel jelölt, zöld) és ABL (SpectrumOrange-vel jelölt, narancs) specifikus próbákat tartalmazott. A BCR próba a teljes 22q11.2 kromoszóma régiót lefedi, beleértve a *BCR* (22q11.23) mellett a *SMARCB1* (22q11.23) gén régióját is. Ezáltal a *SMARCB1* gén mono- vagy biallélikus deléciója a mintákban kimutatható. A

hibridizációs készítmények vizsgálata és a fotók készítése Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkóppal, VDS Vosskuhler CCD-1300 monokróm kamerával és LUCIA™ Citogenetics 1.5.6 szoftverrel történt.

### **5. 5. DNS és RNS izolálás**

A tumorminták reprezentatív FFPE blokkjaiból 5 darab, 15 µm vastagságú metszetet készítettünk 1,5 ml-es sterilizált Eppendorf csövekbe. A xilolos és etanolos deparaffinálást követően RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit-tel (Ambion, Austin, USA) végeztük el a nukleinsavak izolálását a gyártó utasításainak megfelelően. A lézer mikrodisszekált minták esetén az RNS izoláláshoz RNAqueus-Micro Kit-et (Ambion), a DNS izoláláshoz pedig High Pure PCR Template Preparation Kit-et (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) használtunk a gyártók protokolljai szerint. Szövettenyésztési sejtek esetén az RNS-t Purelink RNA Mini Kit-et (Invitrogen, Carlsbad, USA) használva izoláltuk. Az RNS kinyerésekor minden munkafolyamat során figyeltünk a steril/RNáz-mentes körülmények biztosítására, valamint beiktattunk DNáz kezelést is, mint a kit-ek opcionális lépését a reziduális DNS eltávolítására. A nukleinsavak koncentrációját NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Houston, USA) spektrofotométer segítségével mértük le 260 nm hullámhosszon. Az izolált DNS mintákat további felhasználásig 4 °C-on, az RNS mintákat pedig -80 °C-on tároltuk.

### **5. 6. Polimeráz láncreakció (PCR)**

A polimeráz láncreakció (PCR) kisméretű (néhány száz - néhány ezer bázispár) DNS-szakaszok *in vitro* enzimatisz felzaporítására szolgáló módszer. Egy kiválasztott DNS-szakasról két megfelelő iniciáló oligonukleotid (primer), Taq DNS polimeráz és DNS építőkövek (dNTP-k) felhasználásával nagyszámú másolatot készíthetünk néhány óra leforgása alatt. A reakció három lépésből áll:

1. Denaturáció: A kettősszálú DNS-templát szálainak szétválasztása magas hőmérsékleten.
2. Anelláció: A reakcióelegyet hirtelen alacsonyabb hőmérsékletre hűtve lehetővé válik a primerek hibridizálása.
3. Elongáció (Szintézis): Az elegyet melegítve megkezdődik a DNS-szintézis. A polimeráz a hibridizált primerek 3' végeit meghosszabbítva létrehozza a templát DNS kiegészítő szálát.

Az 1., 2. és 3. lépéseket ismételve az enzim az újonnan képződött szálakat is templátként használja, így ideális esetben a primerek által behatárolt DNS-rész mennyisége exponenciálisan nő ( $2^n$ ).

A *SMARCB1* PCR amplifikációja során a gén meghatározott szakaszaira (1-9 exon) specifikus primerek kiválasztása irodalmi adatok alapján [103], illetve a Primer Express 1.1 (Applied Biosystems) primer-tervező program segítségével történt. Az 1-es exonra terveztünk egy új primer párt, mivel az irodalomban feltüntetett oligonukleotidokkal nem lehetett a teljes 1-es exont amplifikálni és így szekvenálni sem. Az 1-es és a 9-es exonokat egy primer párral, a többi exont két primer párral sokszorosítottuk. Az általunk használt primerek lokalizációja, szekvenciája és PCR amplikonok hossza a 4. táblázatban látható. A PCR reakciók anellációs lépésének hőmérsékletét a primerek olvadási hőmérsékletei alapján határoztuk meg. Ennek megfelelően az anellációs hőmérséklet az 1-es exon esetében 60 °C, míg a többi exon esetén 58 °C volt.

**4. Táblázat:** A *SMARCB1* PCR és szekvencia analízis során használt primerek adatai

Lokalizáció	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia	Amplikon hossza
exon-1	5' tctgatccctcgcagcc 3'	5' cccgatgaatggagacgc 3'	237 bp
exon-2a	5' gtggtctcgcgacccttat 3'	5' tctccacagtggctagtgc 3'	128 bp
exon-2b	5' cgaggtctctgtacaagag 3'	5' tacaaccctcgtgaagacg 3'	138 bp
exon-3a	5' cagcagagtgaccagtgat 3'	5' acttctcatcgttgcctcc 3'	122 bp
exon-3b	5' taaaagcctcggaaaggaa 3'	5' tcagaaaagaccccacagg 3'	146 bp
exon-4a	5' tgactgggaggactttcttg 3'	5' tgttgatggttggagcat 3'	127 bp
exon-4b	5' agctcccaccacttagatgc 3'	5' gaactaaggcggaaatcagca 3'	139 bp
exon-5a	5' cgctgactgtgcttccat 3'	5' agcttctgcccatcagct 3'	129 bp
exon-5b	5' ccagctgtgatccatgagaa 3'	5' aagcccgaactgccttcta 3'	131 bp
exon-6a	5' tccttcctctcctgattt 3'	5' gggtaggactcagctgctg 3'	141 bp
exon-6b	5' gatttgaaccgctgacg 3'	5' cagtctgggtgagaagtca 3'	142 bp
exon-7a	5' gtccttgggttgcctca 3'	5' cgatgggtgacaaactcc 3'	160 bp
exon-7b	5' accagagaagttgccctga 3'	5' ggagatgaggaggagaga 3'	157 bp
exon-8a	5' ctactgcctcccctcct 3'	5' ctccatctcagcgtctgca 3'	123 bp
exon-8b	5' agattgccatccggaacac 3'	5' cagagcccaggaccacag 3'	139 bp
exon-9	5' ctcccactcctctccag 3'	5' ggccaatctctgagatgc 3'	108 bp

A PCR reakció 20 µl-es végtérfogatban zajlott RedTaq ReadyMix (Sigma, St. Luis, MO) alkalmazásával, mely gyárilag tartalmaz Taq polimerázt, dezoxi-nukleotid-trifoszfátokat (dNTP-eket) és MgCl<sub>2</sub>-ot. A reakcióelegy pontos összetétele az 5. táblázatban olvasható.

**5. Táblázat:** A PCR reakciók összetétele

Komponens	Bemérés
Red Taq Ready Mix (2x)	10 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
DNS templát	20-50 ng
Desztillált víz	20 µl-ig

Az amplifikáció Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) készülékben történt 45 cikluson keresztül, a 6. táblázatban látható hőprofilnak megfelelően. A PCR termékek tárolása felhasználásukig 4 °C-on történt.

**6. Táblázat: A PCR reakció beállításai**

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Denaturáció	95 °C	10 min.	1
	95 °C	15 sec.	45
Anelláció	58/60 °C	1 min.	
Elongáció	72 °C	30 sec.	
Végső elongáció	72 °C	7 min.	1

**5. 7. A PCR termékek elválasztása, detektálása és tisztítása**

A PCR termékek elválasztása agaróz-gélelektroforézissel történt, 2 vegyes %-os (v%) agaróz gélben (2 g agaróz, 100ml 1x TAE puffer), ethidium-bromid (1µg/ml) jelöléssel. Futtató pufferként is 1x TAE oldatot (10x TAE törzsoldat: 0,4 M TRIS, 0,2 M ecetsav, 0,01 M EDTA) használtunk. A 100 V feszültségen 30 percen át zajló elektroforézist követően a migrációs mintázat UV fényben történő detektálásához KODAK Image Station 4000MM (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) gédokumentációs rendszert használtunk.

A PCR termékek tisztítása ExoSAP-IT (Affymetrix) kittel történt a gyártó utasítása alapján. Ez a kit két hidrolitikus enzimet tartalmaz: az exonukleáz I-et és a Shrimp alkalikus foszfatázt (SAP). Ezekre azért van szükség, mert eltávolítják a PCR reakció során fel nem használandó dNTP-eket és primereket, melyek zavarhatják a későbbi szekvenáló reakciót. Az exonukleáz I az egyszálú DNS-t, a SAP pedig a megmaradt nukleotidokat bontja le nukleozidokra és foszfátra.

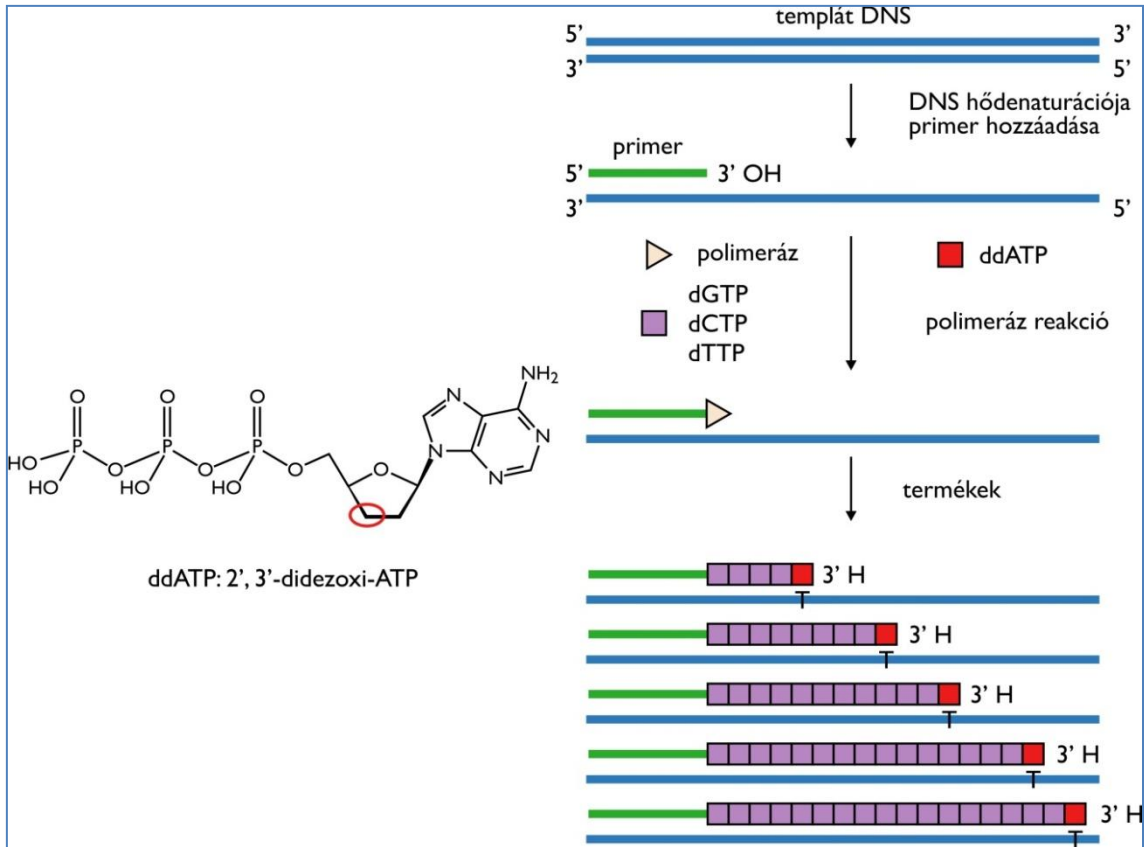
1. A futtatás utáni maradék PCR termékekhez (12 µl) 2 µl ExoSAP-ot adtunk.
2. 30 perc inkubálás 37 °C-on, ezen a hőmérsékleten optimális az enzimműködés.
3. 15 perc inkubálás 80 °C-on az enzimek inaktiválódása érdekében.

## 5. 8. A *SMARCB1* gén szekvencia analízise

A szekvencia analízis elvi alapja a Sanger által leírt ún. láncterminációs eljárás [104], melynek részletei a 6. ábrán láthatóak. Az adott minta szekvenálása a tisztított PCR termék és egy primer (forward vagy reverz orientációjú) felhasználásával történik. A speciális reakcióelegy kiemelt fontosságú komponensei a fluorokrómmal konjugált 2'-3' didezoxi-nukleotid trifoszfát analógok (ddNTP), amelyek a dezoxi-nukleotid trifoszfátokhoz (dNTP) képest a nukleotid cukor komponensének hármasszénatomján sem hordoznak hidroxil funkciós csoportot. E funkciós csoport megléte esszenciális a következő nukleotid beépüléséhez; tehát az extenzió során egy ddNTP beépülése egy adott pozícióba láncterminációt eredményez. A nagy számok törvénye alapján a megfelelő (komplementer) ddNTP beépülése valamennyi pozícióban megtörténik az amplifikáció során. Így a szekvenáló reakció eredményeként a teljes szekvenálandó mintát reprezentáló, különböző hosszúságú termékekkel rendelkezünk.

A termékek méret szerinti elválasztása kapilláris elektroforézissel történik, ami egy speciális összetételű polimerben zajlik. Tekintve, hogy a négy különböző ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) különböző fluoreszcens molekulával van jelölve, a méret alapján történő szeparálás mellett a terminális nukleotidok azonosítása is lehetővé válik. Ez egy lézerrel történő gerjesztéssel, majd az emittált fény hullámhosszának azonosítása által történik. Ezek alapján a számítógép valamennyi termék esetében azonosítja a terminális nukleotidot és azok „összeolvasásával” valósul meg a szekvencia meghatározása.





**6. Ábra:** Egy didezoxi-nukleotid (ddATP) analóg szerkezete és a lánctermináció elve. A ddATP mintájára ddGTP, ddCTP és ddTTP analógok is szükségesek a szekvenáló reakcióhoz. A normál dezoxi-nukleotidhoz (dNTP) képest a didezoxi-nukleotid analógok (ddNTP) a dezoxiribóz hármasszénatomján sem hordoznak hidroxil csoportot. A hármasszénatom hidroxil csoportja feltétlenül szükséges a következő nukleotiddal kialakítandó foszfodiészter kötéshez; hiánya láncterminációhoz vezet. A szekvenáló reakció során az elegy a normál dNTP-k mellett ddNTP analógokat is tartalmaz, amelyek különböző fluorokrómmal konjugáltak a négy különböző analóg esetében. A reakció során a ddNTP-k beépülésének eredményeként eltérő hosszúságú, fluoreszcensen jelölt termékeket nyerünk. Ezután a termékek elválasztása kapilláris elektroforézissel zajlik.

A szekvenciák meghatározását a tisztított PCR termékek direkt, mindkét irányból történő szekvenálásával végeztük el, Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) kitét használva. A Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) PCR készülékben 35 cikluson át zajló szekvenáló reakció (ún. cycle sequencing) pontos összetétele és az amplifikáció hőmérsékleti paraméterei a 7. illetve 8. táblázatban

láthatóak. A szekvenáláshoz a PCR-rel megegyezően a 4. táblázatban felsorolt primereket használtuk.

**7. Táblázat:** A szekvenáló reakció összetétele

Komponens	Bemérés
Big Dye Terminator	1 µl
Big Dye Puffer (2,5x)	1 µl
Primer (10µM)	2 µl
PCR termék	3-5 µl

**8. Táblázat:** A szekvenáló reakció beállításai

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Denaturáció	95 °C	2 min.	1
	95 °C	30 sec.	35
Anelláció	53/58 °C	15 sec.	
Elongáció	60 °C	4 min.	

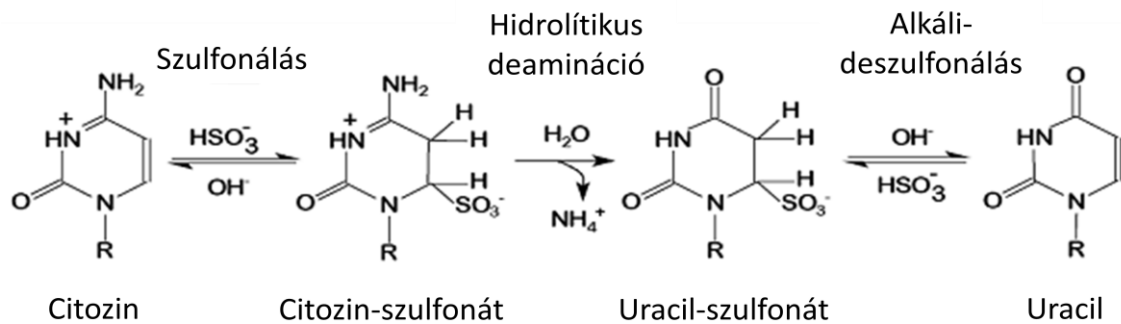
A szekvenáló reakció termékeinek tisztítása során a feleslegben megmaradt és a későbbiekben zavaróvá váló fluoreszcens komponensek eltávolítása történt. Ezt a lépést NucleoSEQ<sup>®</sup> (Macherey-Nagel) oszloppal végeztük el a gyártó utasításai szerint. A tisztított termékeket 20 µl deionizált formamid (Ambion) oldatban vettük fel, majd 95 °C-on 2 perces denaturációt követően az analízisükig jégen tartottuk azokat.

A szekvenciák leolvasása kapilláris elektroforézis módszerével történt, az ABI 310 genetikai analizátor (Applied Biosystems, Foster City, USA) segítségével. A nyers adatok értékeléséhez a Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems), illetve a BioEdit (Isis Pharmaceuticals, USA) programokat használtuk. Az általunk nyert szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisában található, egészséges donoroktól származó referencia szekvenciákhoz illesztettük. A mutációk az elektroferogramokon dupla csúcsok formájában jelentkeztek, vagyis a vad és mutáns típust reprezentáló bázis egyaránt látható. Ez a mutációk heterozigóta jellegével, illetve a normál, mutációt nem hordozó sejteknek a tumorsejtek közötti jelenlétével magyarázható. A mutációk valós

megléteének bizonyításához a PCR termékből forward és reverz irányból való szekvenálást egyaránt végeztünk.

### 5. 9. A DNS biszulfít konverziója

A metiláció közvetett kimutatásának egyik legelterjedtebb formája a biszulfít átalakítás (7. ábra). A reakció során az 5. szénatomon metil csoportot tartalmazó citozinek nem változnak, míg a nem metilált citozin nukleotidok a nátrium-biszulfít hatására uracillá alakulnak.



**7. Ábra:** A biszulfít konverzió folyamata. Savas körülmények között, nátrium-biszulfít jelenlétében a metil csoporttal nem rendelkező citozin nukleotidok nukleofil támadást szenvednek, amely következtében uracillá alakulnak. Az 5-metilcitozin megakadályozza az aminos csoport deaminációját, ezért a molekula változatlan marad. A kép forrása: <http://www.grailmaster.com/genetics/protocols.shtml-Dateien/schumachersguide1.pdf>

Így a metilálatlan citozin pozíciójában egy pontmutáció keletkezik, amely hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel tovább vizsgálható. A DNS minták biszulfít konverzióját Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems) használatával végeztük a gyártói utasításoknak megfelelően. Mintánként 45  $\mu\text{l}$  12 ng/ $\mu\text{l}$  DNS oldathoz 5  $\mu\text{l}$  Denaturation Reagent oldatot adtunk és 50 °C-on 10 percen át denaturáltuk. 100  $\mu\text{l}$  Conversion Reagent hozzáadását követően a konverziót a 9. táblázat hőprofilja alapján végeztük.

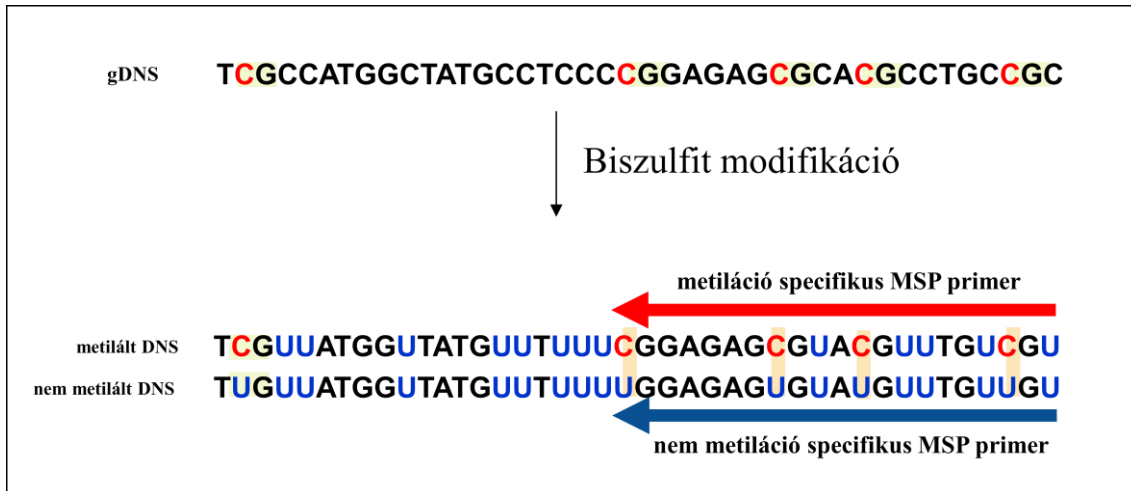
**9. Táblázat:** A biszulfít konverzió hőprofilja

Hőmérséklet	Időtartam
65 °C	30 min.
95 °C	1,5 min.
65 °C	30 min.
95 °C	1,5 min.
65 °C	30 min.
4 °C	max.240 min.

A konvertált terméket Cells-to-CpG oszlopon kötöttük meg, majd mosási és deszulfonálási lépés után a módosított és tisztított terméket 40 µl elúciós pufferben eluáltuk. A konvertált DNS-t ezután aliquotokban -20 °C-on tároltuk.

**5. 10. Metiláció-specifikus PCR (MSP)**

A biszulfít módosított, metilált és nem metilált DNS PCR alkalmazásával megkülönböztethető. A metiláció-specifikus PCR (MSP) működési elve a 8. ábrán látható. Az egyszálú DNS-ben található metil-citozinok (5<sup>m</sup>C) ellenállnak a biszulfít kezelésnek, és a PCR reakció során citozinként szaporodnak fel, míg a metilálatlan citozinok uracillá alakulnak és timinként amplifikálódnak. Fontos megjegyezni, hogy MSP alkalmazásával kizárólag a primerek bekötődési helyén lévő CpG szigetek metiláltságáról kapunk információt.



**8. Ábra:** A metiláció-specifikus PCR elve. Biszulfit kezelést követően a metilált specifikus primer (piros nyíl) csak a metilált DNS-hez kötődik, míg a nem metilált specifikus primer (kék nyíl) a nem metilált DNS-t ismeri fel és azt amplifikálja. Az ábrán a primer párok egyik-egyik tagja szerepel csak.

A MSP-hez szükséges primereket manuálisan terveztük, úgy hogy azok szelektíven amplifikálják vagy a metilált vagy a nem metilált DNS-t. Összesen hét metiláció specifikus és hét nem metiláció specifikus primer párt terveztünk, melyeket a 10. táblázatban sorolunk fel. A metiláció specifikus primereinkkel a *SMARCB1* promóterben lévő CpG szigetek mintegy 40%-áról szerzünk információt. Az FFPE eredetű DNS-ek minőségét a biszulfit konverzió tovább gyengíti, ezért rövid, 80-117 bázispár közötti PCR ampikonokat választottunk. A primer párokat a BiSearch programmal (<http://bisearch.enzim.hu>), a „Primer search, ePCR” felületen ellenőriztük. A program primer páronként egy terméket jósolt, a várt lokalizációban. Technikai (negatív és pozitív) kontrolloknak a Semmelweis Egyetem Sejtanalitikai Laboratóriumától kaptuk a következő mintákat. Perifériás vér mononukleáris sejtjeiből izolált és Repli-g kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával a gyártó utasításai szerint amplifikált, ezáltal teljesen metilátlan DNS termék szerepelt negatív kontrollként a MSP reakciókhoz. Metilált pozitív kontrollként pedig az előbbi templát DNS CpG (M.SssI) Metiltranszferázzal (New England Biolabs, Ipswich, USA) a gyártó leírásainak megfelelően metilált terméket alkalmaztunk. A primerek tesztelését gradiens PCR módszerrel végeztük el. Az optimális anellációs hőmérsékletek a 10. táblázatban

láthatóak. A PCR reakciók 15 µl végtérfogatban 7,5 µl AmpliTaq Gold® 360 Master Mix-et (Applied Biosystems), 1-1 µl forward illetve reverz primert (10µM), 15 ng összmenyiségű biszulfít konvertált terméket, valamint kiegészítésként PCR tiszta vizet tartalmaztak. Az amplifikáció Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) készülékben történt 35 cikluson keresztül, a 11. táblázatban látható hőprofilnak megfelelően. A reakció után a metilált, illetve a nem metilált DNS szakaszokat agaróz-gélelektroforézissel ethidium bromidos jelölést használva mutattuk ki.

#### 10. Táblázat: A metiláció-szenzitív PCR-hez tervezett primerek adatai

Primer neve*	Forward primer, 5' →3' <sup>#</sup>	Reverz primer, 5' →3' <sup>#</sup>	Méret (bp)	An. hőm. § (°C)	Genomiális pozíció †
M01	GTTGTTAAGATTTTGG <u>CGTC</u>	TCCCGTTTCTTTAC <u>G</u> TCTAA	80	55	+319
NM01	AGTGTGTTAAGATTTTGGTGT	TCCCATTTCTTTACATCTAACTA	80	52	+316
M02	GAT <u>CGGTTTC</u> GAGGTAGTTC	<u>CG</u> CCCCGATAAAATAAAAAC	112	56	+81
NM02	ATGATTGGTTTTGAGGTAGTTT	CCCACCCCAATAAAATAAAAAC	112	53	+79
M03	<u>CGTTAA</u> <u>CGTTAG</u> <u>CGTTGC</u>	ACGAAATACGAACCGAACC	111	59	-212
NM03	TAGTGTAAATGTTAGTGTGTTGT	AAAACAAAATACAAACCAAACC	111	51	-215
M04	<u>CGGTG</u> GAGG <u>CGTT</u> AGTATT <u>C</u>	<u>CG</u> AAACCGAAAAACGAAAATA	51	57	-140
NM04	GTTTGGTTGAGGTGTTAGTATT	ACCAAAACCAAAAAACAAAATAC	51	53,5	-143
M05	<u>TCGTT</u> <u>CGTTTT</u> GT <u>CGTC</u>	ATATAAAACTC <u>CGC</u> <u>GC</u> GC	101	58	-22
NM05	GGTTGTTTGTGTTTGTGTTGTT	ATATAAAACTCACCATCATCCT	101	51	-24
M06	<u>CGTAGTT</u> <u>CGGTTT</u> <u>CGGTC</u>	ATATAAAACTC <u>CGC</u> <u>GC</u> GC	117	58	-38
NM06	TTTTGTAGTTTGGTTTTGGTT	ATATAAAACTCACCATCATCCTC	117	52	-41
M07	GTTTTTTAAGGGGTT <u>CGC</u>	CTCAATACGCAAACGCTAAC	91	56	-276
NM07	GTGGTTTTTTAAGGGGTTGTT	CCTCAATACACAAACACTAACA	91	54	-279

\*M: metilált-specifikus primerek; NM: nem metilált-specifikus primerek. # Az aláhúzott és félkövér citozinok (C) a forward primerek esetén, az aláhúzott és félkövér guaninok (G) a reverz primerek esetén jelentik azokat a citozinokat a promóter CpG szigetében, melyeket MSP-vel vizsgálni tudunk. §An. hőm: anellációs hőmérséklet. †A primereket a transzkripció start hely közelébe terveztük. A genomiális pozíció a forward primer 5'-végi nukleotidjának a helyzete a *SMARCB1* gén transzkripció start helyéhez viszonyítva.

#### 11. Táblázat: A metiláció-specifikus PCR beállításai

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Denaturáció	95 °C	5 min.	1
	95 °C	15 sec.	35
Anelláció	51-59 °C	30 sec.	
Elongáció	72 °C	15 sec.	
Végső elongáció	72 °C	7 min.	1

### **5. 11. Lézer mikrokimetszés (LCM- Laser Capture Microdissection)**

Hét epithelioid sarcoma mintából, RNS izolálás céljából, tumorsejteket és normál szöveti sejteket (endotélsejteket, limfocitákat) mikrodisszekáltunk PALM lézer mikrodisszekációs rendszer (PALM, Bernried, Németország) segítségével. Öt mintán pedig a tumorsejtek DNS-ének kinyerése céljából végeztünk el mikrokimetszést. A mikrodisszekációt a II. Belgyógyászati Klinika kutatólaboratóriumában volt lehetőségünk végrehajtani. A tumorminták paraffinos blokkjaiból speciális mikrodisszekációra alkalmas tárgylemezre (Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jéna, Németország) 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A paraffin metszetek leválásának elkerülése érdekében a membrános tárgylemezeket használat előtt 254 nm-es UV fény alatt tartottuk 30 percig, ezáltal növelve a membrán adhezivitását. A SMARCB1 negatív tumorsejtek azonosításának érdekében a metszeten SMARCB1 immunfestést végeztünk. Amennyiben az RNS kinyerése volt a cél, nagyfokú óvatossággal jártunk el az RN-áz mentes környezet megőrzése miatt a teljes munkafolyamat során. A minták deparaffinálása és az antigén feltárás az 5. 3. Immunhisztokémia fejezetben leírtaknak megfelelően történt, az immunfestést manuálisan a Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle, Egyesült Királyság) kit használatával végeztük a gyártó leírása szerint. A mintákat 30 percen át hagytuk száradni a mikrodisszekációkat megelőzően. A lézer mikrokimetszések során átlagosan 3000 tumorsejtet gyűjtöttünk mintánként. Pozitív kontrollként ugyanennyi SMARCB1 immunreaktív endotélsejtet és/vagy limfocitát izoláltunk.

### **5. 12. Reverz transzkripció (RT)**

Vizsgálataink során a reverz transzkripciót, azaz cDNS szintézist kettő fajta kísérlethez kétféle kit használatával végeztük el. A normál génexpressziós vizsgálatokhoz a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems, Foster City, USA) használtunk a gyártó ajánlása alapján. 500-1000 ng RNS konverzióját hajtottuk végre 20 µl végtérfogatban. A reverz transzkripció reakció

összetétele a 12. táblázatban található. A reakció a Veriti® 96-Well Thermal Cycler PCR készülékben zajlott – 10 perces 25 °C-on történő inkubációt követően – 120 percen keresztül 37 °C-on, végül 5 perces inaktivációval zárult 85 °C-on.

**12. Táblázat:** A reverz transzkripció mix összetétele

Komponens	Bemérés
RT puffer (10x)	2 µl
dNTP mix (100mM)	0,8 µl
Random primer (10x)	2 µl
Reverz transzkriptáz (50 U/µl)	1 µl
RNS templát	0,5-1 µg
Nukleáz mentes víz	20 µl-ig

A miRNS expressziós vizsgálatokhoz a cDNS szintézist a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük. Azonban nem random primerekkel dolgoztunk, hanem a TaqMan® Small RNA Assay-k (Applied Biosystems) miRNS specifikus primereivel. 10 ng RNS mintát írtunk át 15 µl végtérfogatban, mely 7 µl master mix-et és 3 µl RT primert tartalmazott az RNS mintán túlmenően. A master mix összetétele a 13. táblázatban található. Az összetevők vegyítését követően a mintát 5 percig jégen tartottuk, majd PCR készülékben 30 percen át 16 °C-on, ismét 30 percen át 42 °C-on és végül 5 percen keresztül 85 °C-on inkubáltuk. A két módon készült cDNS mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

**13. Táblázat:** A „miRNS reverz transzkripció master mix” összetétele

Komponens	Bemérés
RT puffer (10x)	1,5 µl
dNTP mix (100mM)	0,15 µl
RNáz inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Reverz transzkriptáz (50 U/µl)	1 µl
Nukleáz mentes víz	4,16 µl



### 5. 13. *In silico* miRNS target predikció

A *SMARCB1* gént (Gene ID: 6598) targetáló miRNS-ek predikciójához *in silico* analízist használtunk. Számos online elérhető algoritmust lefuttattunk párhuzamosan, de csak a következő öt adott ki találatokat: MiRBase Target v5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) [105], MirTarget2 (<http://mirdb.org/miRDB/>) [106], Targetscan 4.0 (<http://www.targetscan.org>) [107], RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) [108] és Pita (<http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/index.html>) [109]. A potenciális miRNS-ek közül azokat részesítettük előnyben, amelyeket mind az öt program vagy legalább négy előre jelzett.

### 5. 14. Sejtkultúra és miRNS tranziens transzfekció

Két humán tumor és egy normál, nem tumoros sejtvonalat tenyésztettünk a transzfekciós kísérletekhez, melyekről tudtuk, hogy kifejezik a *SMARCB1* gént. A HT-1080 nevű humán fibrosarcoma sejtvonalat (ATCC szám: CCL-121) RPMI-1640 tápfolyadékban (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 10% fetal bovine serum (FBS) és penicillin-streptomycin antibiotikumok mellett (rendre 100U és 100 µg/ml koncentrációban) tenyésztettük. A Caco-2 nevű humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalat (ATCC szám: HTB-37) minimum essential mediumban (MEM) α-glutamin (Sigma-Aldrich) kiegészítéssel, 20% FBS, 1% nem esszenciális aminosav, valamint a fent említett antibiotikumok hozzáadása mellett növesztettük. A HDFα nevű humán bőr fibroblaszt sejtvonal (Invitrogen, Carlsbad, USA) a speciális Medium 106 (Gibco®) tápfolyadékot igényelte Low Serum Growth Supplement (LSGS, Invitrogen) hozzáadásával. Mindhárom vonal esetén a sejteket 75 cm<sup>2</sup>-es szövettenyésztő flaskában (Sarstedt, Newton, USA) tartottuk 5% CO<sub>2</sub>-nál 37 °C-on. A médiumokat hetente kétszer cseréltük a sejteken.

Az RNS interferencia funkcionális vizsgálatához a tranziens transzfekcióra alkalmas miRNS-eket Pre-miR™ miRNA Precursor molekulák formájában (Ambion) szereztünk be: hsa-miR-206 (assay ID PM10409), hsa-miR-381 (assay ID PM10242),

hsa-miR-671-5p (assay ID PM12599) és hsa-miR-765 (assay ID PM11892). Ezeket a kicsi, kémiaiilag módosított kettős szálú RNS molekulákat arra tervezték, hogy az endogén, érett miRNS-ek biológiai hatását mimikálni legyenek képesek. A sejtekbe való bejutásukat követően az RNS-indukálta csendesítő komplexbe (RISC, RNA induced silencing complex) épülve specifikus mRNS-ek repressziójában vagy azok hasításában vesznek részt. A géncsökkentés kísérletekhez pozitív kontrollnak a Pre-miR™ hsa-miR-1 miRNA Precursor-t (Ambion) választottuk, amely ismertén csendesíti a *twinfilin-1* (más néven *PTK9*, *protein tirozin kináz 9*) gént. Negatív kontroll miRNS-nek pedig Pre-miR™ Negative Control #1-et (Ambion) használtuk, mely random szekvenciájú molekulákból áll és nem rendelkezik validált miRNS általi funkcionális hatásokkal. A sejtvonalakat elektroporációval transzfektáltuk a Neon™ transzfekciós rendszer 10 µl-es pipetta hegyének segítségével (Invitrogen) a gyártó leírását követve a 14. táblázatban olvasható paraméterek alkalmazásával. Egy elektroporációs reakcióhoz  $3 \times 10^5$  darab sejtet és 30 nM végkoncentrációjú miRNS-t szuszpendáltunk 10 µl „Transfection Resuspension Buffer R” oldatban. Majd az egész elegyet a Neon készülék pipetta hegyébe szívtuk fel és ebben zajlott le pillanatok alatt maga az elektroporáció is. A reakciót követően a transzfektáns sejteket 6-lyukú szövettenyésztő lemez egyetlen lyukába, 2 ml a sejteknek megfelelő, de antibiotikumtól mentes tápfolyadékba szélesztettük. A kísérleteket a sejtek transzfekcióját követő 24. órában végeztük. A HT-1080 transzfektáns sejteket 48 órát követően is vizsgáltuk. Ko-transzfekciós (azaz a miRNS-ek együttes transzfekcióját jelentő) vizsgálatokhoz a HDFα sejtvonalat használtuk és a miRNS-ek együttes végkoncentrációja ez esetben is 30 nM volt.

**14. Táblázat:** Az elektroporáció paraméterei a sejtvonalak esetén

Sejtvonal	Impulzus feszültsége	Impulzus ideje	Impulzusszám
HT-1080	950 V	50 ms	1
Caco-2	1300 V	20 ms	2
HDFα	1400 V	20 ms	2

### 5. 15. Valós-idejű kvantitatív PCR (q-RT-PCR)

A *SMARCB1* mRNS expressziós szintjének analízisét valós-idejű kvantitatív PCR (real-time, q-RT-PCR) segítségével végeztük el. Valamint ugyanezt a módszert használtuk az epithelioid sarcoma mintáink miRNS expressziójának meghatározásához. Az epithelioid sarcoma FFPE minták teljes szöveti blokkokból (n=16) és lézer mikrodisszekátumaiból (n=7) készült *SMARCB1* q-RT-PCR-hez a következő primereket terveztük: *SMARCB1*-forward (5'-TCCGTATGTTCCGAGGTTC-3') és *SMARCB1*-reverse (5'-CTTCCACTTCCGAGGCTTT-3'). A reakció 20 µl végtérfogatban 12,5 µl 2x-es AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Applied Biosystems) és 1x-es LightCycler<sup>®</sup> 480 Resolight Dye (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) interkaláló festék keverékét, 10-10 µM forward és reverz primert, 50 ng cDNS templátot és kiegészítésként nukleáz mentes vizet tartalmazott. Belső kontrollként *glyceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH)* gént amplifikáltunk, kalibrátorként normál humán májszövetet használtunk. A LightCycler<sup>®</sup> 480 II. (Roche Applied Science) típusú valós-idejű PCR készülékben zajló reakció hőprofilja a 15. táblázatban található.

**15. Táblázat:** A q-RT-PCR hőprofilja

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Denaturáció	95 °C	5 min.	1
	95 °C	10 sec.	45
Anelláció	59 °C	10 sec.	
Elongáció	72 °C	20 sec.	

A tumorok miRNS expressziós és a géncsendesítéseket követő génexpressziós q-RT-PCR vizsgálatokhoz TaqMan<sup>®</sup> alapú (Applied Biosystems) expressziós rendszereket használtunk. A következő miRNS-ek expressziós szintjét határoztuk meg: hsa-miR-1 (assay ID 002222), hsa-miR-206 (assay ID 000510), hsa-miR-381 (assay ID 000571), hsa-miR-502 (assay ID 001109), hsa-miR-548a (assay ID 001538), hsa-miR-619 (assay ID 001595), hsa-miR-671-5p (assay ID 197646\_mat), and hsa-miR-765 (assay ID 002643). Belső kontrollnak RNU6B-t (assay ID 001093), kalibrátornak normál humán

zsírszövetet alkalmaztunk. A PCR amplifikáció 40 cikluson keresztül 20  $\mu$ l végtérfogatban zajlott. A reakcióelegy pontos összetétele a 16. táblázatban látható. A cDNS templát a miRNS specifikus reverz transzkripciókból származott. A LightCycler<sup>®</sup> 480 II. (Roche Applied Science) típusú valós-idejű PCR készülékben zajló TaqMan reakció hőprofilja a 17. táblázatban található. Ez a hőprofil az ún. két-lépéses PCR-nek felel meg, ahol az anelláció és az elongáció egyazon hőmérsékleten megy végbe.

**16. Táblázat:** A reakcióelegy összetétele

Komponens	Bemérés
TaqMan Master mix (2x)	10 $\mu$ l
TaqMan Small RNA Assay (20x)	1 $\mu$ l
cDNS templát	1,33 $\mu$ l
Nukleáz mentes víz	7,67 $\mu$ l

**17. Táblázat:** A TaqMan q-RT-PCR hőprofilja

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Aktiváció	50 °C	2 min.	1
Denaturáció	95 °C	10 min.	40
	95 °C	15 sec.	
Anelláció-Elongáció	60 °C	60 sec.	

A géncsendesítéseket követő q-RT-PCR kísérletekhez *SMARCB1* TaqMan assay-t (Hs00992522\_m1), pozitív kontrollnak *PTK9* assay-t (Hs00702289\_s1), belső kontrollnak *GAPDH* assay-t használtunk. 50 ng cDNS templátot mértünk be 20  $\mu$ l végtérfogatú reakcióba. A PCR hőprofilja megegyezik a 17. táblázatban feltüntetettekkel. Valamennyi valós-idejű PCR esetében három párhuzamos reakciót futtattunk. Az eredményeket  $C_p$  értékek formájában nyertük. A  $C_p$  érték („crossing point”; megfelel  $C_T$ -nek is, ami a „cycle threshold” jelölése) azt a ciklusszámot jelöli, ahol a relatív fluoreszcencia szint elér egy beállított küszöbértéket, a reakció exponenciális fázisában. A relatív expressziós szintek számolása a  $\Delta\Delta C_p$  módszerrel történt [110].

## 5. 16. Immuncitokémia

Immuncitokémiához  $3 \times 10^5$  darab transzfektáns HDF $\alpha$  sejtet szélesztettünk 6-lyukú szövettenyésztő lemez egy lyukába tett 22 x 22 mm-es üveg fedőlemezre. A szélesztés után 24-48 órával a sejteket metanollal fixáltuk (PBS-es mosás után 10 perc -20 °C-os metanol, szárítás és -20 °C-on tárolás). Az így előkészített mintákat a fixálás után és az egyes lépések között is PBS-sel mostuk (3 x 5perc). A SMARCB1 immunfestést manuálisan a Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle, Egyesült Királyság) kit használatával végeztük a gyártó leírása szerint. Az 5-5 perces peroxidáz és protein-blokkolások (mindkét reagens a kit része) után a mintákat nedves kamrában 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az elsődleges anti-BAF47 (SMARCB1) ellenanyaggal (klón 25, hígítás 1:50). Ezt követően 30 perces Post Primary és 30 perces Polymer oldatos (mindkét reagens a kit része) inkubációk következtek. Az immunreakciót a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB szubsztrát/chromogén oldatok (szintén a kit részei) segítségével hívtuk elő, 5 perces inkubáció során. Záró lépésként a sejtmagokat hematoxilinnal festettük. A reakciókat a SMARCB1 festődés sejtmagi megléte vagy hiánya alapján értékeltük.

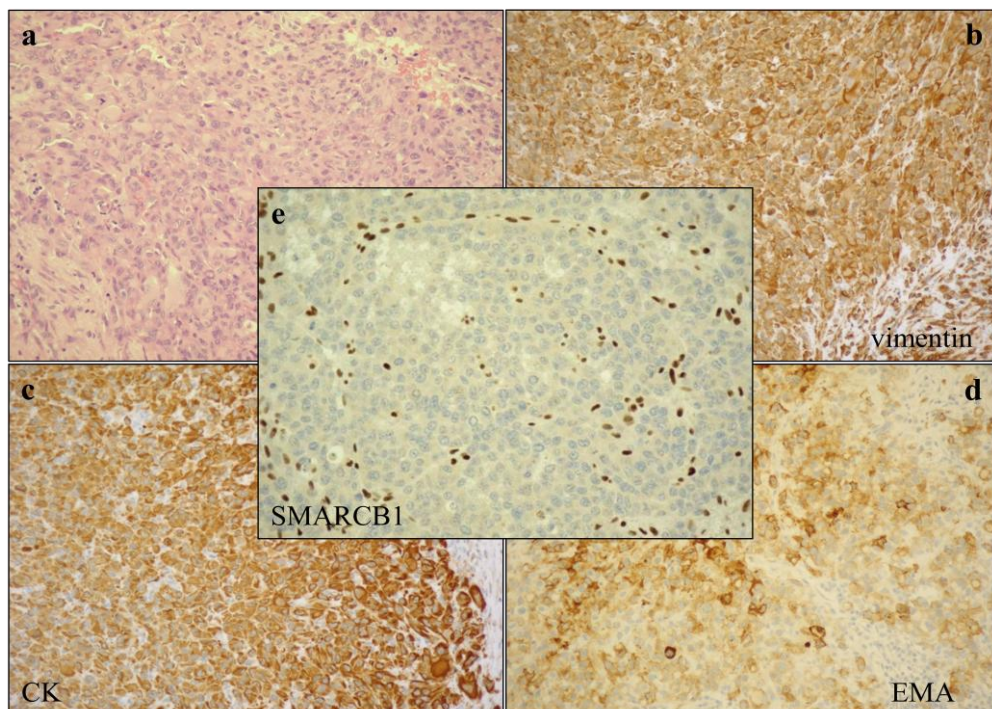
## 5. 17. Statisztikai módszerek

Az eredmények értékeléséhez Graphpad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) statisztikai elemző programot használtunk. A miRNS és génexpressziós q-RT-PCR vizsgálatok során a csoportok összehasonlításához one-way ANOVA-t és Tukey post-hoc tesztet alkalmaztunk. Azokat a különbségeket fogadtuk el szignifikánsnak, ahol a p érték kisebb volt 0,05-nél.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6. 1. Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálatok

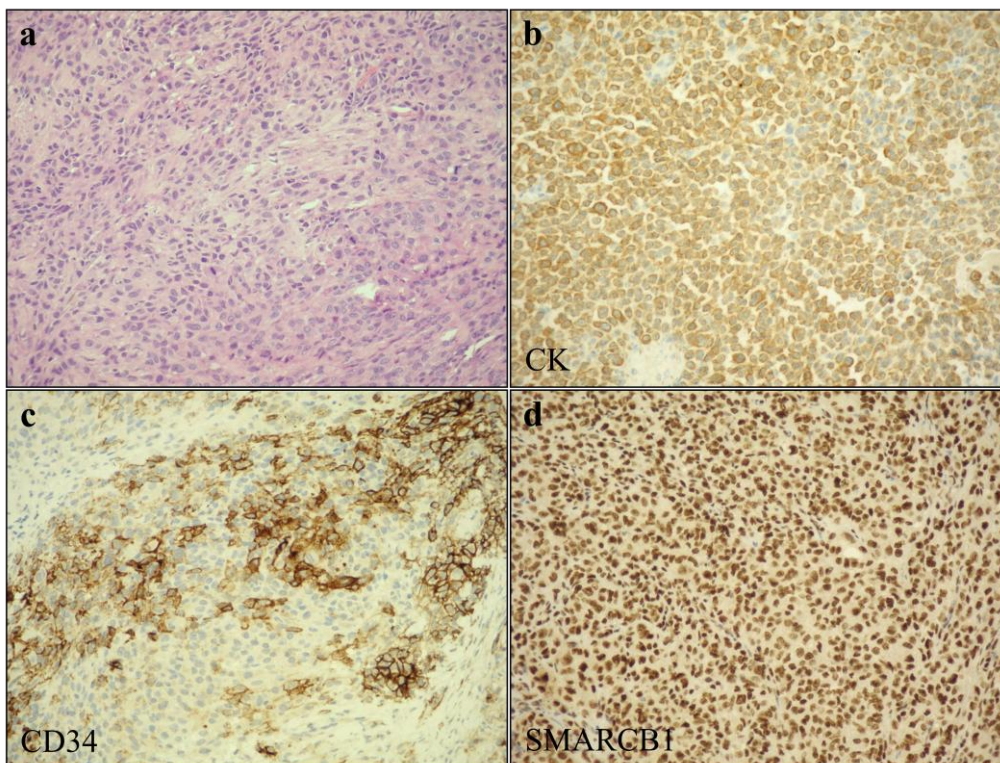
Az összegyűjtött 36 epithelioid sarcoma közül 20 (az esetek 56%-a) adódott disztális típusúnak, míg a fennmaradó 16 (az esetek 45%-a) proximális típusú volt. SMARCB1 immunhisztokémiával 31 tumorminta (az esetek 86%-a) esetén találtuk a sejtmagi reakció hiányát a daganatsejtekben, míg a tumort infiltráló limfociták, endotélsejtek és környező normál szöveti elemek egyértelműen SMARCB1 pozitívnak mutatkoztak. Az epithelioid sarcoma diagnózist a következő immunhisztokémiai reakciók segítségével állapítottuk meg: diffúz vimentin pozitivitás, legalább fokálisan erős keratin (AE1/AE3) és/vagy EMA pozitivitás, S100 negativitás és SMARCB1 negativitás (9. ábra).



**9. Ábra:** Disztális típusú epithelioid sarcoma (esetszám 29.) tipikus morfológiai képe és immunhisztokémiai fenotípusa. A tumorsejtek jelentős eozinofil citoplazmával és kis sejtmaggal rendelkeznek (a: H&E festés; 20x nagyítás). Karakterisztikus a vimentin (b; 20x nagyítás), a citokeratin (AE1/AE3) (c; 20x nagyítás) és az EMA (d; 20x nagyítás) együttes expressziója. SMARCB1 negatív

tumorsejtek, míg a normál stróma sejtjei, ill. a limfociták SMARCB1 pozitívak (e; 40x nagyítás).

Mindössze öt epithelioid sarcoma (az esetek 14%-a) esetében mutatkoztak SMARCB1 pozitívnak a daganatos sejtmagok. A morfológiai jellegzetességeken túl a CD34 immunhisztokémiai festés pozitivitása erősítette meg az epithelioid sarcoma diagnózisokat (10. ábra). Ezen SMARCB1 pozitív daganatok közül két minta a miRNS expressziós kísérletekben szerepel kontrollként, amúgy a genetikai és epigenetikai vizsgálatokhoz a SMARCB1 immunnegatív epithelioid sarcoma mintákat használtuk.



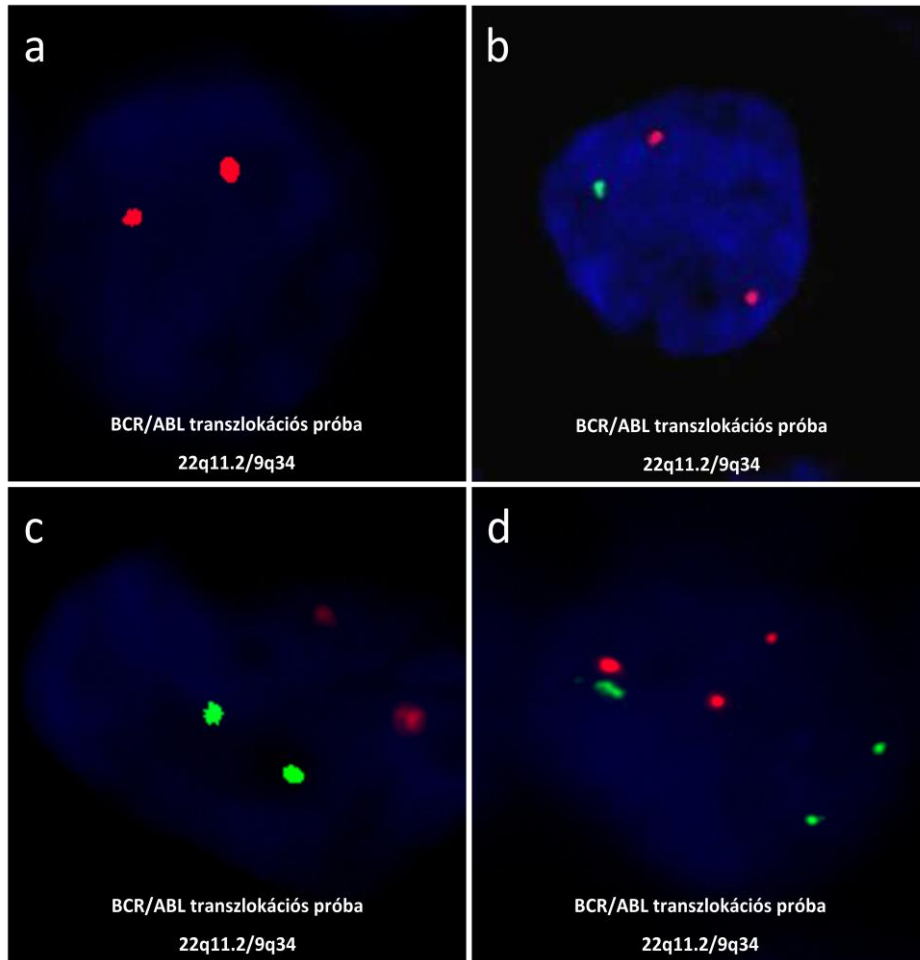
**10. Ábra:** Proximális típusú epithelioid sarcoma (esetszám 33.) jellegzetes morfológiai (a: H&E festés; 20x nagyítás ) és immunhisztokémiai képei. Karakterisztikus citokeratin (AE1/AE3) (b; 20x nagyítás) és CD34 (c; 20x nagyítás) pozitivitás, ellenben megtartott SMARCB1 fehérje expresszió (d; 20x nagyítás).

## 6. 2. *SMARCB1* genetikai vizsgálatok

### 6. 2.1. *Fluoreszcens In Situ Hibridizáció*

Ahogy korábban az 5. 4. fejezetben is feltüntettük, a BCR/ABL transzlokációs FISH próba használatával kimutatható BCR szignál vagy szignálok elvesztése a *SMARCB1* kromoszóma régió kiesését is jelenti a tumorsejtekben. A 9-es kromoszómán elhelyezkedő *ABL* (9q34) gén pozitív kontrollként szerepelt. Ha mindkét *SMARCB1* allél deléció szenvedne el a tumorsejtekben, akkor ezzel magyarázható lenne a *SMARCB1* fehérje nukleáris expressziójának hiánya. Azonban mindösszesen négy *SMARCB1* negatív epithelioid sarcoma esetében találtunk ún. biallélikus vagyis mindkét *BCR/SMARCB1* allélt érintő deléció (11a. ábra). Ezekben a mintákban csak a kontroll narancsszínű *ABL* szignálok láthatók a daganatok sejtmagjaiban. Egyetlen *BCR/SMARCB1* allél elvesztése, tehát egy zöld BCR szignál megléte 11 daganat esetében volt kimutatható (11b. ábra). A fennmaradó 16 epithelioid sarcomában kromoszómális eltérés FISH reakcióval nem volt detektálható (11c. ábra). Poliszómiát, vagyis a kromoszómák többszöröződését összesen öt epithelioid sarcomában találtunk, melyből egy eset triszómiásnak (11d. ábra), négy pedig tetraszómiásnak mutatkozott. A BCR/ABL transzlokációs próba használatával mindössze a 22-es és a 9-es kromoszómákat vizsgáltuk, így aneuploidiát erről a két kromoszómáról igazoltunk. Azonban irodalmi adatok szerint a szerkezeti és számbeli kromoszóma eltérések epithelioid sarcomában relatíve gyakorinak mondhatóak [111].



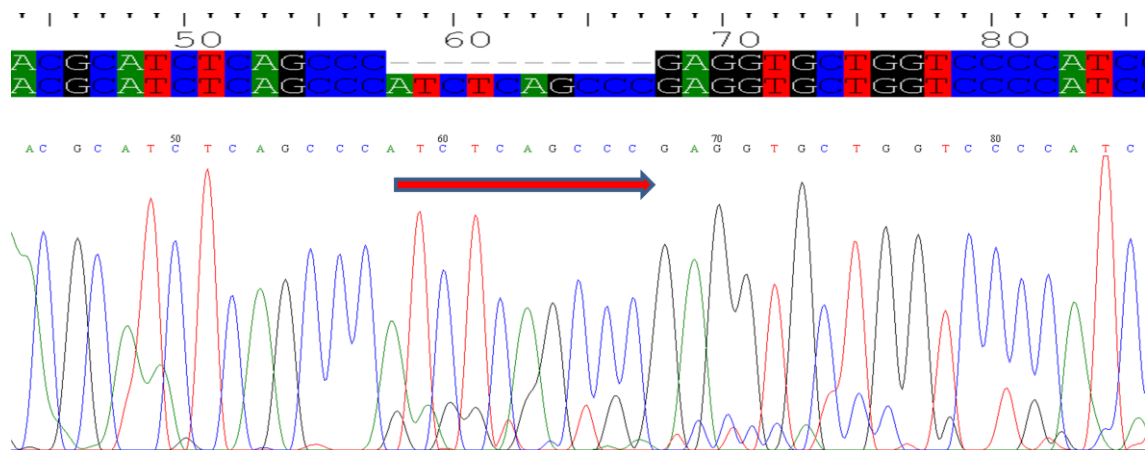


**11. Ábra:** A FISH vizsgálat eredményei epithelioid sarcomában. A narancsszínű szignálok az *ABL* régiót (9q34), a zöld szignálok a *BCR/SMARCB1* régiót (22q11.2) reprezentálják. Biallélikus *BCR/SMARCB1* deléció (**a**), monoallélikus *BCR/SMARCB1* deléció (**b**). Allélvesztéssel nem rendelkező tumorsejtek (**c**; **d**). Triszómiás epithelioid sarcoma sejt (**d**).

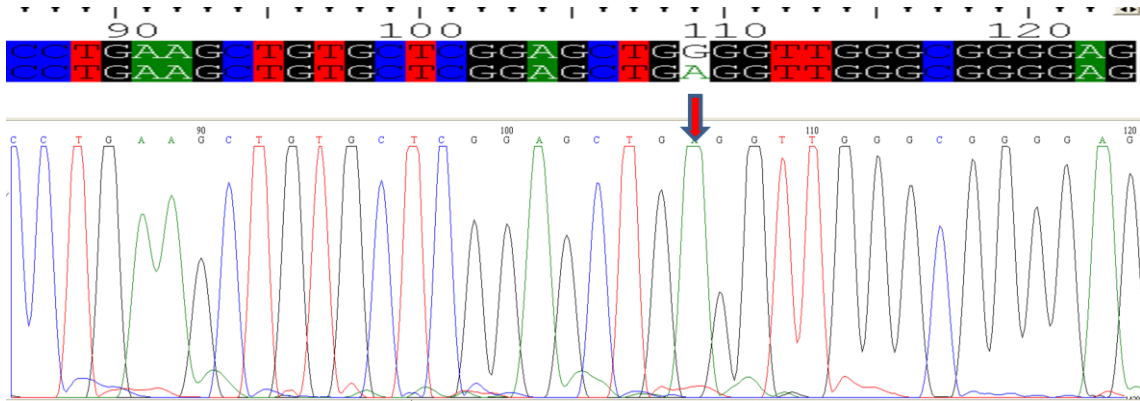
### 6. 2.2. A *SMARCB1* gén szekvencia analízise

Azoknak az epithelioid sarcomáknak végeztük el a *SMARCB1* gén szekvencia analízisét, amelyekben FISH reakcióval nem volt kimutatható a 22q11.2 kromoszóma régió biallélikus deléciója. Tehát összesen 27 tumorminta *SMARCB1* génjének 9 exonját PCR amplifikáltuk és direkt szekvenáltuk az esetleges mutációk felderítése céljából.

Mindössze két epithelioid sarcomában találtunk *SMARCB1* mutációt, az egyik tumorban a gén 5-ös exonjában egy 10 bázispáros duplikációt (ATCCTAGCC) (12. ábra), míg a másik daganatban a gén 7-es exonjában egy pontmutációt (GGG>AGG) (13. ábra) mutattunk ki. A duplikáció a leolvasási keret eltolódását, míg a pontmutáció Glicin > Arginin aminosav cseréjét eredményezte. Mindkét szekvencia eltérés olyan tumorban volt, amelyekben FISH reakcióval monoallélikus deléciót találtunk. Így együttvéve a négy esettel, ami biállélikus deléciót mutatott FISH-sel, összességében hat epithelioid sarcomáról mondható el, hogy bennük a *SMARCB1* biállélikus deléciója/mutációja tehető felelőssé a gén inaktiválódásáért.



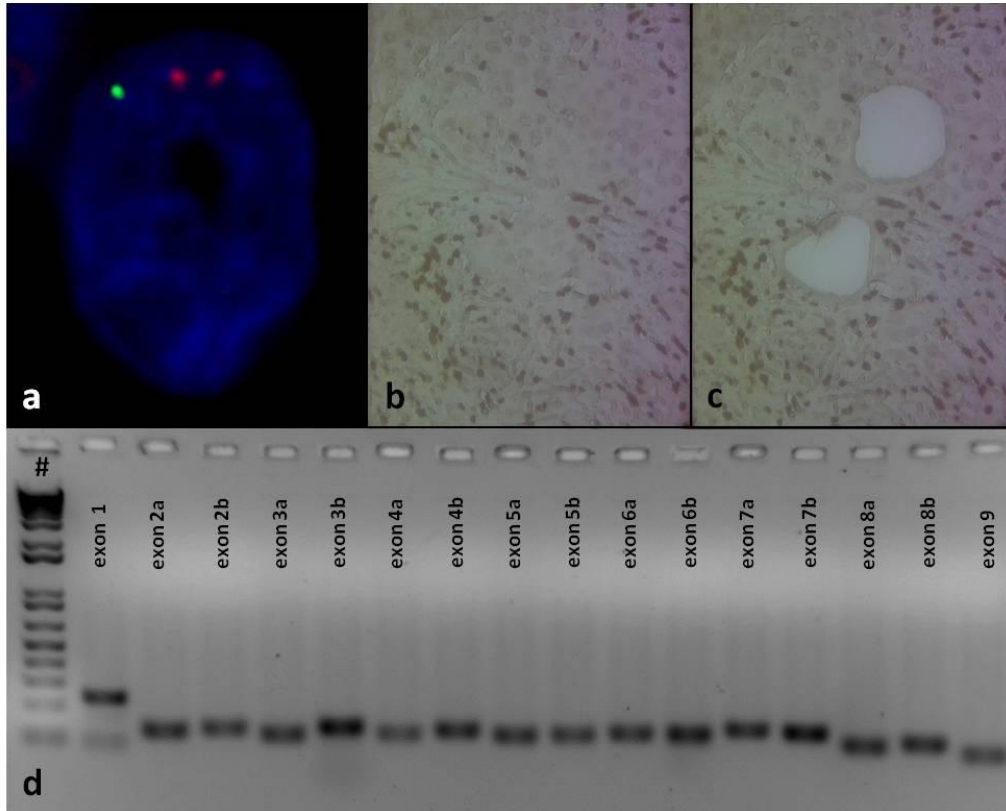
**12. Ábra:** ATCCTAGCC duplikáció a *SMARCB1* gén 5-ös exonban. Az elektroferogramon a nyíl pozíciójában látható a 10 bázispáros ismétlődés.



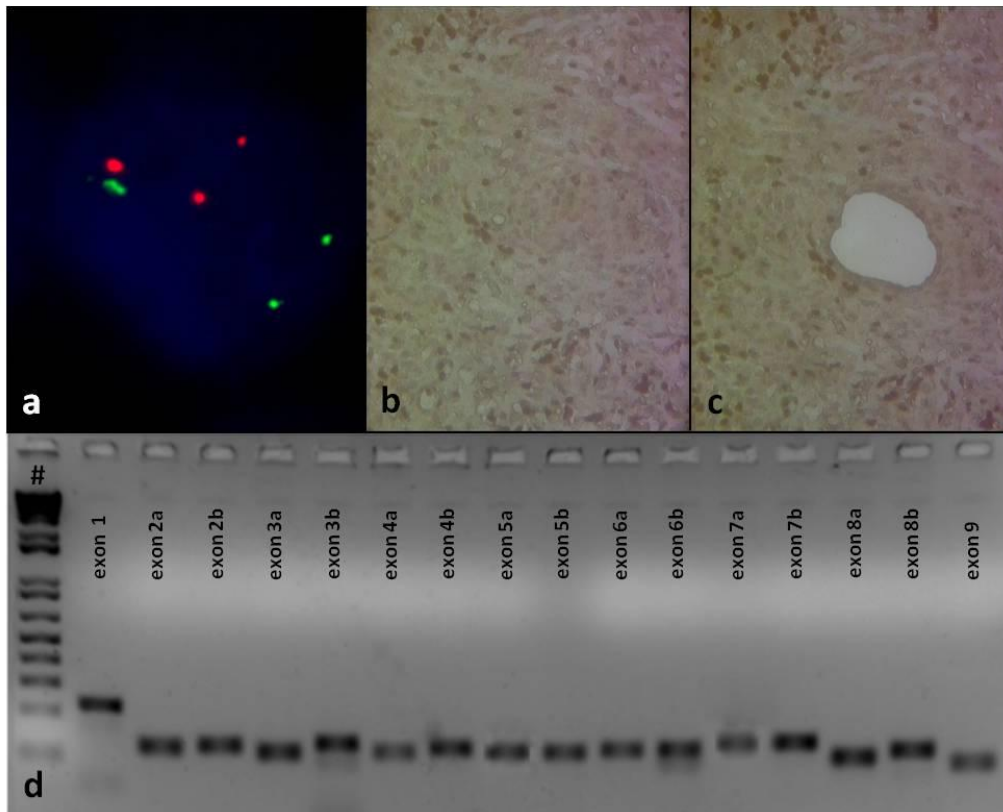
**13. Ábra:** G> A pontmutáció a *SMARCB1* gén 7-es exonban. A nyíl jelzi a mutáns adenint, továbbá az elektroferogram alapján az is megállapítható, hogy a szekvenált minta többnyire daganat sejteket tartalmazott (a vad típusú guanint reprezentáló csúcs nem jelentkezett).

### 6. 2.3. A FISH eredmények validálása

Az eddig tárgyalt FISH és szekvenálási eredményeink publikálását [112] követően jelent meg az irodalomban egy közlemény, mely szerint a *SMARCB1* inaktivációjáért az epithelioid sarcomák döntő többségében mégis a gén biallélikus deléciója felelős [113]. Mivel az alkalmazott FISH próba nagyobb kromoszóma régiót fed át, mint egyetlen gén régiója, ezért előfordulhatott, hogy a kisebb delécióktől meglététől függetlenül a próba a DNS-hez hibridizálni képes. Annak érdekében, hogy ezeknek a kisebb delécióknak (pl. a gén egyes exonjainak teljes deléciói) a lehetőségét kizárjuk és kizárólag a tumorsejtek DNS-ét vizsgáljuk, határoztunk a lézer mikrokimetszést követő PCR amplifikáció elvégzése mellett. A validáláshoz három epithelioid sarcoma esetet választottunk, melyek monoallélikus delécióval bírtak (14. ábra), valamint kettő olyan daganatot, melyek FISH vizsgálata allélvesztést nem mutatott (15. ábra). Mindegyik mikrodisszekált és csak daganatsejteket tartalmazó minta esetében sikeresen sokszoroztuk PCR módszerrel a *SMARCB1* gén 9 exonját. Az exonok meglétét a PCR termékekről készült elektroforetikus gékép alapján azonosítottuk (14d-15d. ábrák), ezáltal a biallélikus deléciók előfordulását a tumorsejtekben kizártnak vehettük.



**14. Ábra:** FISH eredmények PCR validációja. Monoallelikusan deletált epithelioid sarcoma FISH eredménye (a). SMARCB1 immunhisztokémia lézer mikrodisszekciót megelőzően (b; 40x nagyítás). A SMARCB1 negatív tumorsejtek mikrodisszekciója, a reaktív szöveti elemek kivágását elkerültük (c; 40x nagyítás). A *SMARCB1* exonok, mint PCR termékek azonosítása gélelektroforézissel (d).

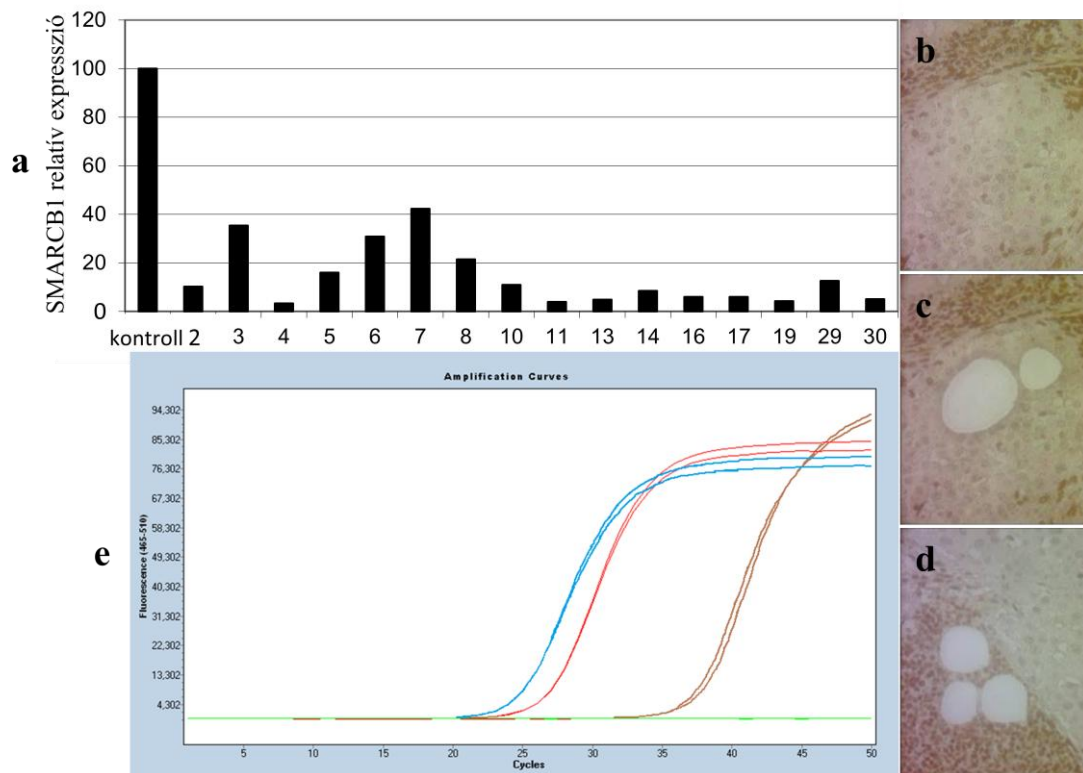


**15. Ábra:** FISH eredmények PCR validációja. Deléció nem mutató, *SMARCB1* vad típusú epithelioid sarcoma FISH eredménye (a). *SMARCB1* immunhisztokémia lézer mikrodisszekciót megelőzően (b; 40x nagyítás). A *SMARCB1* negatív tumorsejtek mikrodisszekciója, a reaktív szöveti elemek kivágását elkerültük (c; 40x nagyítás). A *SMARCB1* exonok, mint PCR termékek azonosítása gélelektroforézissel (d).

### 6. 3. A *SMARCB1* mRNS expressziós szintjének meghatározása

A *SMARCB1* mRNS szintjének meghatározásához elsőként a teljes szöveti blokkokból izolált epithelioid sarcoma mintákat használtuk (n=16). A kvantitatív valós-idejű PCR eredményeként a kontroll májszövethez képest több mint a felére lecsökkent *SMARCB1* expressziót tudtunk kimutatni mind 16 mintában, amit a 16a. ábra diagramján tüntetünk fel. Kilenc tumor mintája az RNS-ük gyenge minősége miatt alkalmatlannak bizonyult ehhez a vizsgálathoz. Feltételeztük, hogy a stróma és más normál sejtek (limfociták, fibroblasztok, endotélsejtek, stb.) jelenléte kontaminációt

okozhat a génexpresszió mérése során. Az eltérő normál és tumor szövet arányok következtében kaptuk a különböző *SMARCB1* mRNS szinteket. Emiatt döntöttünk hét, legalább egy intakt *SMARCB1* alléllal bíró epithelioid sarcomából tumor és kontroll normál sejtek immunfestést követő mikrodisszekciója mellett (16b, c és d. ábra). A csupán daganatos sejtek mintáiban *SMARCB1* mRNS expressziót már nem detektáltunk q-RT-PCR módszerrel (16e. ábra). Azonban a kontroll sejtekben a *SMARCB1* transzkriptum meglétét igazolni tudtuk (16e. ábra).



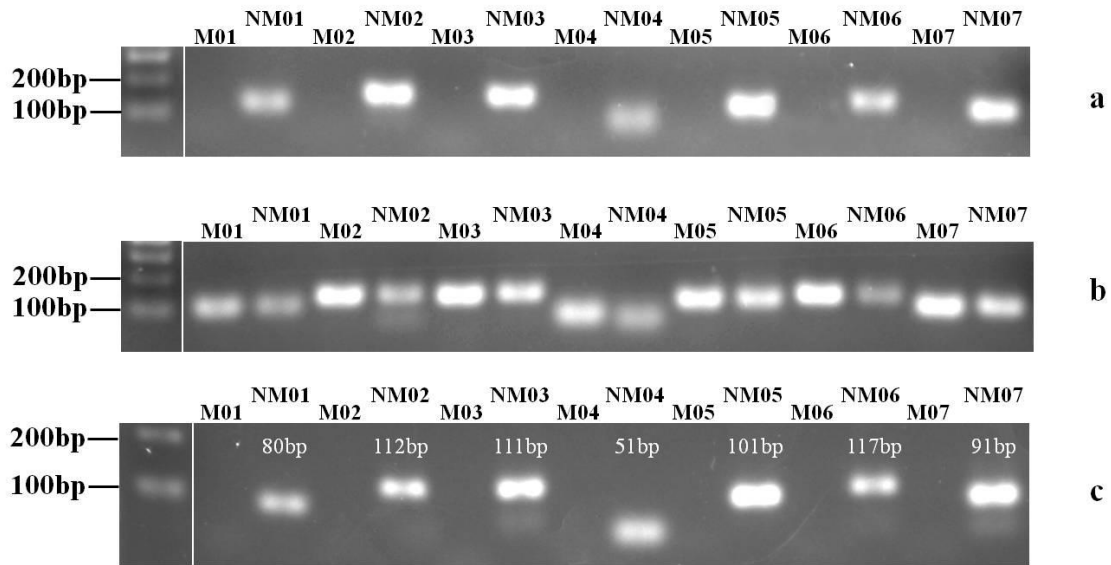
**16. Ábra:** A *SMARCB1* génexpresszió meghatározásának eredményei. A *SMARCB1* lecsökkent mRNS mennyiségei a heterogén szöveti összetételű epithelioid sarcoma mintákban q-RT-PCR-rel meghatározva (**a**). *SMARCB1* immunhisztokémia lézer mikrodisszekciót megelőzően (**b**; 40x nagyítás). Elkülönülten mikrodisszekált tumorsejtek (**c**; 40x nagyítás) és *SMARCB1* pozitív limfociták (**d**; 40x nagyítás). q-RT-PCR amplifikációs görbék: kontroll *GAPDH* (kék-limfociták, narancs-tumorsejtek), *SMARCB1* (barna-limfociták). A tumorsejtek mintáiból *SMARCB1* mRNS nem amplifikálódott (zöld alapvonal)(**e**).

## 6. 4. *SMARCB1* epigenetikai vizsgálatok

Összességében 25 *SMARCB1* negatív epithelioid sarcoma esetén nem találtunk biallélikus genetikai eltérést a *SMARCB1* gént illetően. Ezért az epigenetikai szabályozó folyamatok közül elsőként a *SMARCB1* promóterének metilációját és majd az EZH2 fehérje expressziót és az EZH2 mediálta H3K27 trimetilációt vizsgáltuk meg.

### 6. 4.1. *SMARCB1* promóter metiláció

Elsőként a technikai kontrollnak kapott DNS mintákon teszteltük a metiláció-specifikus PCR-hez tervezett primereinket. A teljesen metilálatlan, negatív kontroll DNS templátról csak a nem metiláció specifikus primerek amplifikáltak PCR termékeket, ahogy ezt a 17a. ábra gélelektroforézis képe is mutatja. Az *in vitro* metiltranszferázzal metilált, pozitív kontroll DNS templát PCR amplifikációja során a metiláció és a nem metiláció specifikus primerek egyaránt felsokszorozták a specifikus nukleinsav szakaszokat, amint ez a 17b. ábrán látható. Ez a metilációs heterogenitás arra utal, hogy a kontroll DNS *in vitro* metilációja nem működhetett 100%-os hatásfokkal, maradtak metilálatlan allélek is a mintában. Ennek ellenére, a kontrollok használatával megbizonyosodhattunk a módszer és primereink megbízható működésében. A 25 biszulfít konvertált epithelioid sarcoma DNS-ének MSP vizsgálatával azt találtuk, hogy a *SMARCB1* gén promóterében nincsenek metilált citozinok, mivel a PCR-ek során minden tumor esetében kizárólag a nem metiláció specifikus termékek amplifikálódtak. A 17c. ábra egy reprezentatív epithelioid sarcoma MSP módszert követő gélelektroforézis eredményét mutatja.



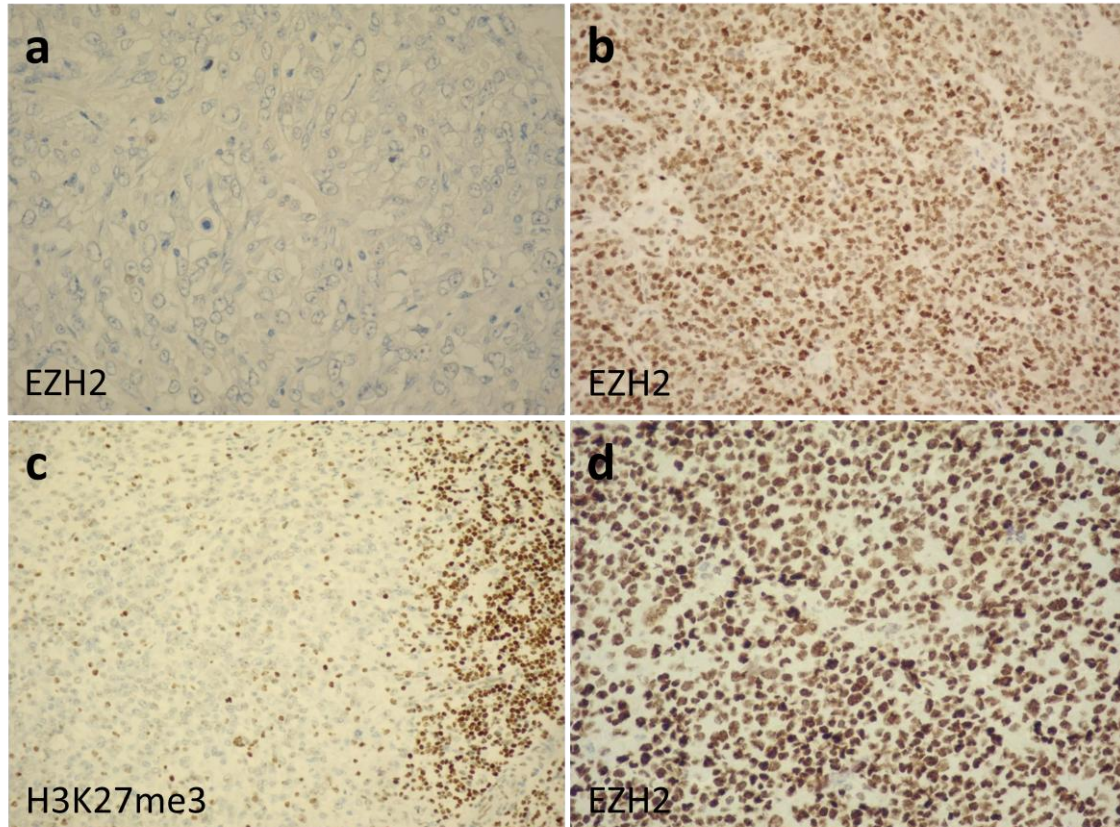
**17. Ábra:** A *SMARCB1* promóter metiláció-specifikus PCR (MSP) termékeinek azonosítása gélelektroforézissel. Negatív kontroll DNS minta MSP amplifikációja (a). Pozitív kontroll DNS minta MSP amplifikációja (b). Epithelioid sarcoma biszulfit módosított DNS-ének MSP amplifikációja (c).

#### 6. 4.2. *EZH2* mediálta *H3K27* trimetiláció

Az epithelioid sarcomák hiszton metilációs kísérleteit az *EZH2* metiltranszferáz fehérje expresszió immunhisztokémiai kimutatásával kezdtük. Majd a hiszton H3 lizin27 oldalláncának trimetilációját ( $H3K27me3$ ), mint az *EZH2* mediálta metiláció funkcionális bizonyítékát, szintúgy immunfestésekkel vizsgáltuk. Az *EZH2* fehérje expressziót mind a 36 epithelioid sarcoma esetében az 5. 3. fejezetben leírt pontozási rendszer alapján értékeltük. Az epithelioid sarcomák összesített átlagos pontértéke  $2,97 \pm 1,55$  (átlagérték  $\pm$  szórás), tehát megállapítottuk, hogy az *EZH2* overexpresszió nem jellemző az epithelioid sarcomára. Három vagy annál kevesebb pontértéket 25 daganat (69%) kapott, így ezeket *EZH2* negatívnak ( $2,2 \pm 1,14$ ) tartottuk (18a. ábra). A fennmaradó 11 epithelioid sarcoma (31%; kilenc proximális és két disztális típus) *EZH2* pozitívnak ( $4,73 \pm 0,9$ ) bizonyult. A legmagasabb hatos értéket három proximális típusú epithelioid sarcoma (8%) esetében kaptuk (18b. ábra). Irodalmi adatok szerint az *EZH2* overexpresszió a malignus rhabdoid tumorokra jellemző [114], amit a malignus



rhabdoid tumor mintákon is igazoltunk (18d. ábra). A H3K27me3 antitest, ami a kizárólag a háromszorosan metilált lizin27 oldalláncot ismeri fel a H3-as hisztonon szintén negatív immunhisztokémiai reakciót mutatott az összes vizsgált epithelioid sarcoma minta tumorsejtjeiben (18c. ábra).



**18. Ábra:** EZH2 és H3K27me3 immunhisztokémia eredmények. EZH2 negatív epithelioid sarcoma (a; 40x nagyítás). EZH2 pozitív proximális típusú epithelioid sarcoma (b; 20x nagyítás). H3K27me3 reakció epithelioid sarcomában, a tumorsejtek negatívak, míg a kép jobb szélén látható limfoid csoport sejtei pozitívak (c; 20x nagyítás). EZH2 erős pozitivitás malignus rhabdoid tumorban (d; 20x nagyítás).

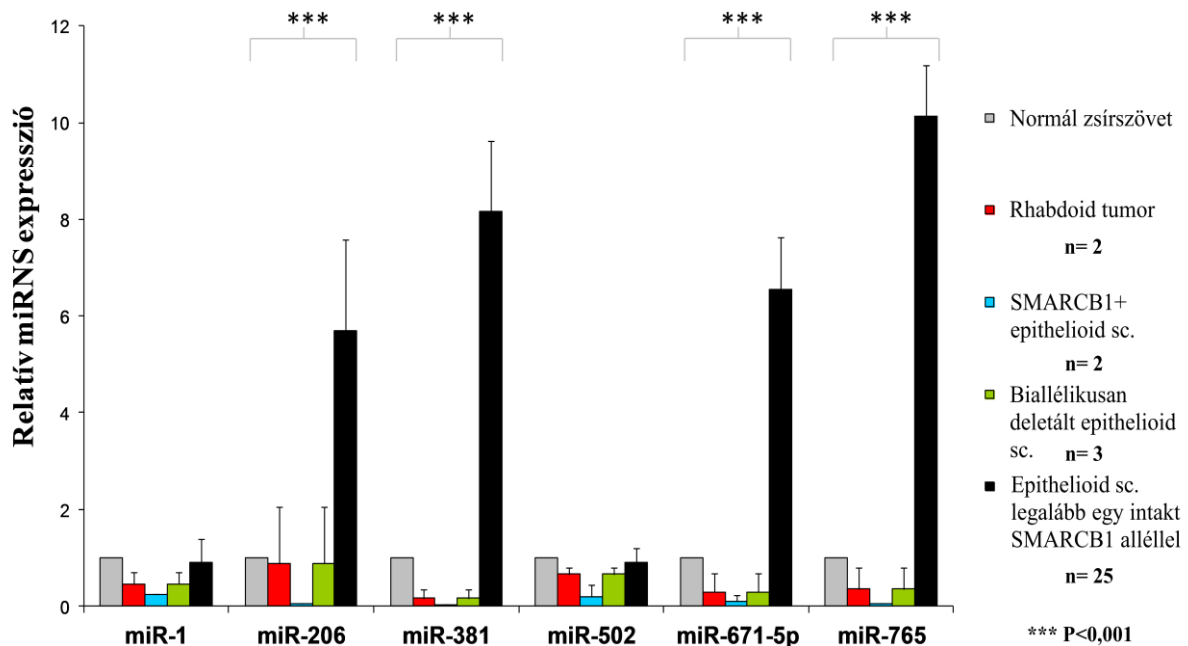
#### 6. 4.3. A *SMARCB1* mRNS-t célzó miRNS-ek azonosítása

##### 6. 4.3.1. *In silico* target predikció

Az öt target predikciós algoritmussal (lásd Módszerek 5.13 fejezet) összesen 80 miRNS-t azonosítottunk, amelyek a *SMARCB1* 3'-UTR régióját lehetségesen célozzák. Ezek közül egyetlen miRNS-t, a miR-206-ot mindegyik algoritmus jelezte. Érdekesség, hogy a miR-206-ot a *SMARCB1*-hez társítja egy online mRNS adatbázis is, melyet egy sarcomákat vizsgáló kutatócsoport hozott létre [115]. Hét további miRNS-t (miR-1, miR-381, miR-502, miR-548a, miR-619, miR-671-5p, miR-765) legalább négy program azonosított, míg a maradék 72 miRNS-t már csak három vagy kevesebb algoritmus jelezte. A fent konkrétan megnevezett nyolc miRNS-t választottuk ki további kísérleteink végrehajtásához. A miRNS-ek expresszióját kvantitatív valós-idejű PCR módszerrel 30 epithelioid sarcoma (25 legalább egy intakt *SMARCB1* alléllal rendelkező tumor, három biállélikusan deletált daganat és két *SMARCB1* pozitív epithelioid sarcoma) és két malignus rhabdoid tumor mintában vizsgáltuk.

#### 6. 4.3.2. Target predikciós programokkal kiválasztott miRNS-ek expressziója epithelioid sarcomában

Négy miRNS mutatott szignifikánsan magasabb expressziót ( $p < 0,001$ ; 19. ábra) a 25 epithelioid sarcoma mintában (melyek legalább egy genetikailag intakt *SMARCB1* alléllal rendelkeztek) összehasonlítva a három kontroll csoport mintáival (két malignus rhabdoid tumor, két *SMARCB1* pozitív epithelioid sarcoma és három *SMARCB1* biállélikusan deletált epithelioid sarcoma) és a normál zsírszövettel. A miR-206 5,7-szeres, a miR-381 8,17-szeres, a miR-671-5p 6,55-szörös és a miR-765 10,12-szeres átlagos emelkedését találtuk. A miR-1 és a miR-502 expressziós szintje megegyező vagy lecsökkent értékeket mutatott az összes csoportot tekintve. Ugyanakkor a miR-548a és a miR-619 nem voltak detektálhatóak egyik fent említett szövettípusban sem.



19. Ábra: A miRNS-ek expressziójának meghatározása q-RT-PCR módszerrel. (\*\*\*)  $p < 0,001$

#### 6. 4.4. A miRNS-ek hatásának funkcionális vizsgálata sejtenyészetekben

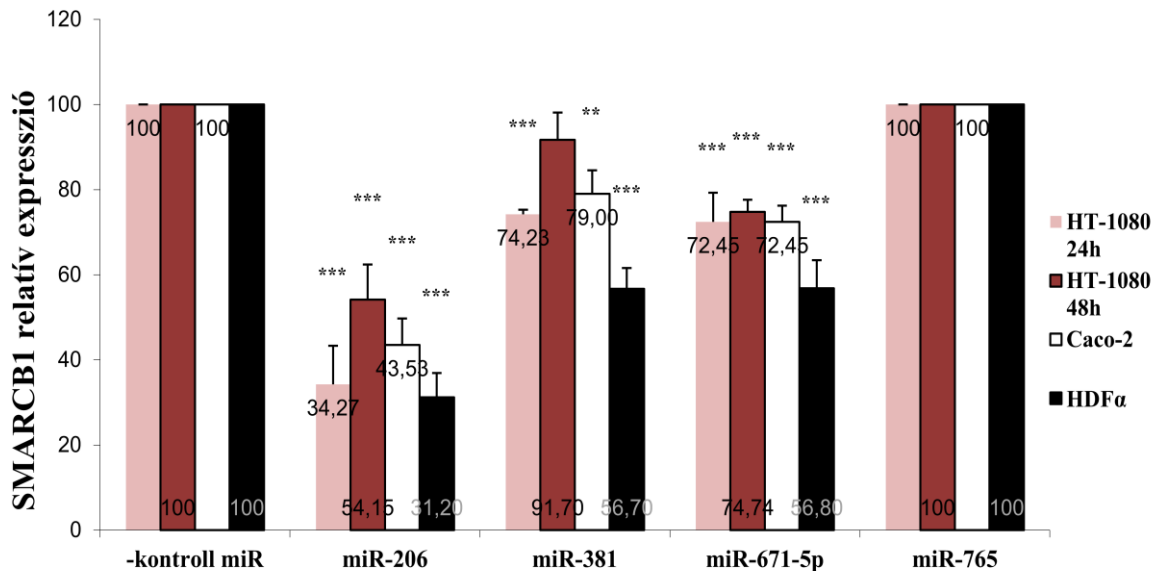
##### 6. 4.4.1. A miR-206, miR-381, miR-671-5p és miR-765 géncsendesítés hatása a *SMARCB1* génexpresszióra

Annak igazolására, hogy az epithelioid sarcomában emelkedett expressziót mutató miRNS-ek funkcionálisan képesek szabályozni a *SMARCB1* génátíratok mennyiségét, vagyis csendesíteni tudják ezt a tumorszupresszort, HT-1080, Caco-2 és HDF $\alpha$  sejtvonalakat transzfektáltunk. A kísérleteket megelőzően mindhárom sejtvonal esetében q-RT-PCR módszerrel megbizonyosodtunk arról, hogy sejteik kifejezik a *SMARCB1* gént. A miR-206, miR-381, miR-671-5p, miR-765 és a negatív kontroll miRNS-ekkel való transzfekciókat követő 24, illetve a HT-1080 sejtekkel 48 óra után is megmértük a *SMARCB1* mRNS expressziót kvantitatív valós-idejű PCR módszerrel.

A HT-1080 sejtekben a miR-206, miR-381 és miR-671-5p által közvetített csendesítés rendre 34,27%-ra, 74,23%-ra és 72,45%-ra csökkentette le szignifikánsan a

*SMARCB1* mRNS szintjét 24 óra elteltével (20. ábra;  $p < 0,001$ ). 48 órát követően a miR-206 és a miR-671-5p szignifikánsan csökkentették 54,15%-ra és 74,74%-ra az mRNS szintet, a miR-381-nek nem volt szignifikáns hatása. Tehát 24 órával a miRNS transzfekciót követően rendszerünkben intenzívebb a géncsökkentés hatása, összehasonlítva azt a 48 órás kísérlettel.

A miR-206, miR-381 és miR-671-5p transzfekció a Caco-2 sejtekben 43,53%-ra, 79%-ra és 72,45%-ra, a HDF $\alpha$  sejtekben 31,2%-ra, 56,7%-ra és 56,8%-ra csökkentette szignifikánsan a *SMARCB1* mRNS szintjét (20. ábra;  $p < 0,001$  és  $p < 0,01$ ). Meglepetésünkre, a miR-765-nek nem találtuk funkcionális hatását a sejtekben, pedig ez a miRNS mutatta a legmagasabb szintű expressziót az epithelioid sarcomákban. A leghatékonyabb géncsökkentő miRNS molekulának a miR-206 bizonyult.

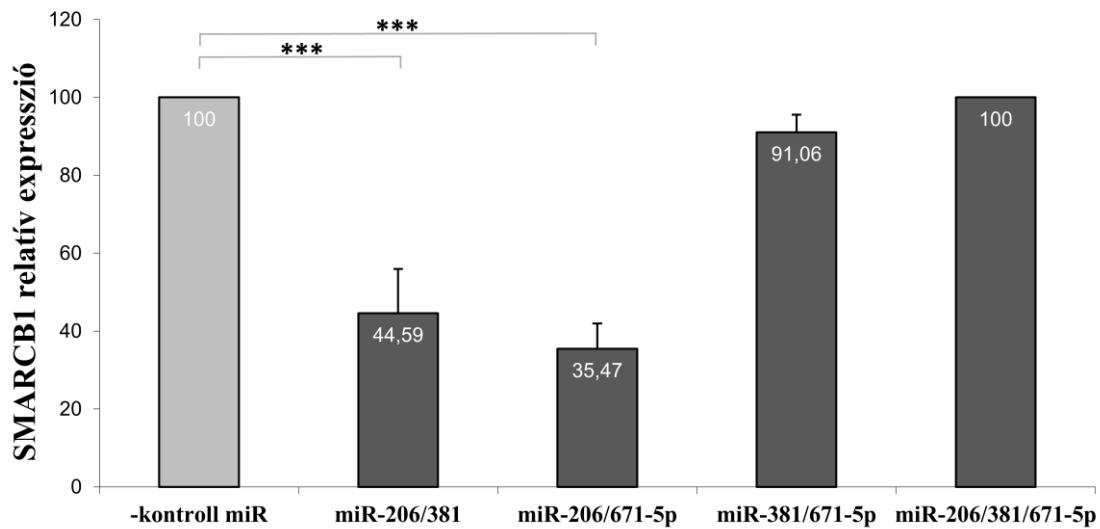


**20. Ábra:** A *SMARCB1* géncsökkentésének változásai a miR-206, miR-381, miR-671-5p, miR-765 és a negatív kontroll miRNS transzfektáns sejtekben q-RT-PCR-rel mérve.

(\*\*\* $p < 0,001$  és \*\* $p < 0,01$ )

Annak kiderítésére, hogy a miR-206, miR-381 és miR-671-5p által közvetített géncsökkentő folyamatok szinergisztikusan működnek-e, együttesen transzfektáltuk (ún. ko-transzfekcióval) a HDF $\alpha$  sejteket a fent említett három miRNS molekula kombinációival és 24 óra elteltével határoztuk meg a *SMARCB1* mRNS szinteket (21. ábra). A miR-206/381 és a miR-206/671-5p kombinációk ugyan szignifikánsan

csökkentették ( $p < 0,001$ ) 44,59%-ra és 35,47%-ra a *SMARCB1* génexpressziót, de a miR-206 általi csendesítés önmagában hatékonyabbnak bizonyult a HDF $\alpha$  sejtvonalban. Vagyis a miRNS-ek szinergizmusra utaló funkcióját kísérleti rendszerünkben bizonyítani nem tudtuk. A miR-381/671-5p kombinációnak már nem detektáltunk szignifikáns géncsökkentő hatását a *SMARCB1* mRNS-re. Érdekesnek tartottuk, hogy a hármas miRNS kombináció transzfekciója nem befolyásolta a *SMARCB1* expressziót. Mindez egy küszöbhatás folyamatát sejteti, konkrétan azt, hogy a hármas kombinációban az egyes miRNS koncentrációk nem érték el a csendesítéshez szükséges szintet.

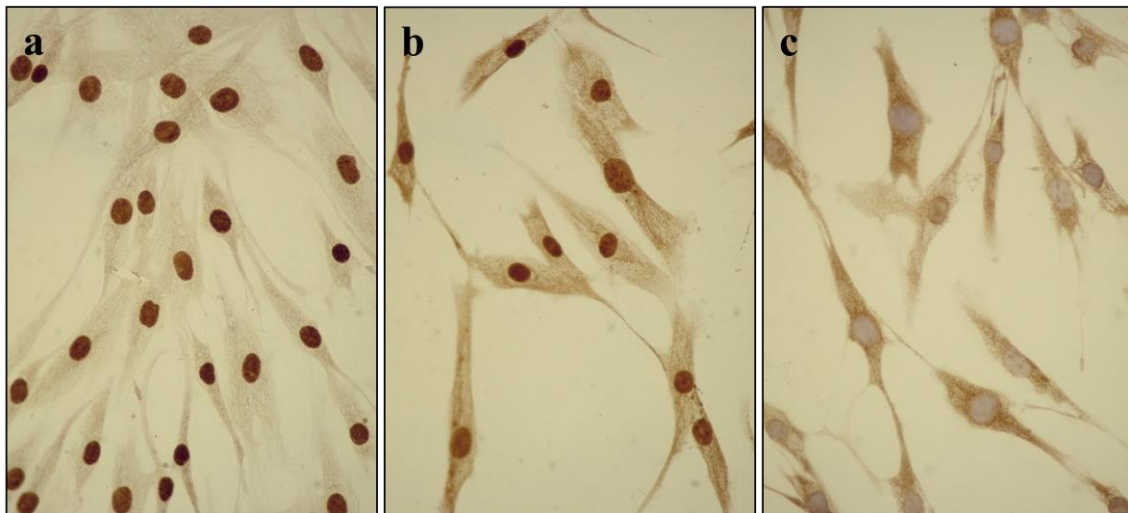


**21. Ábra:** A *SMARCB1* génexpressziójának változásai a miR-206, miR-381, miR-671-5p kombinációk és a negatív kontroll miRNS transzfektáns HDF $\alpha$  sejtekben q-RT-PCR-rel mérve. (\*\*\*) $p < 0,001$ )

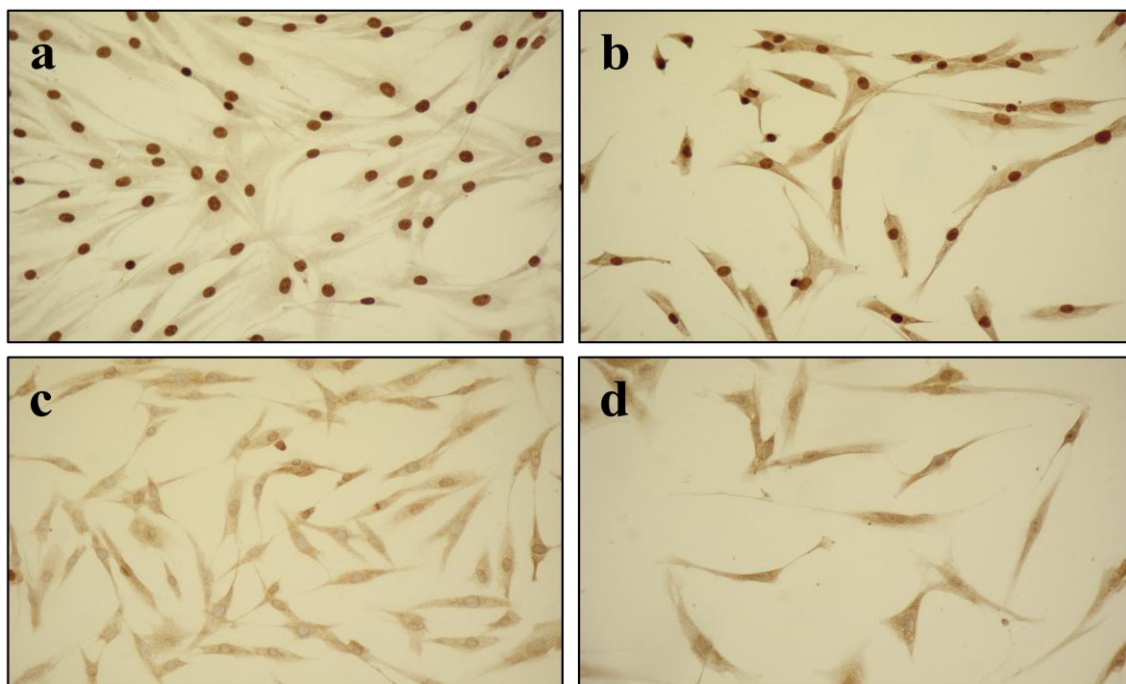
#### 6. 4.4.2. A miR-206, miR-381 és miR-671-5p géncsökkentés hatása a *SMARCB1* fehérje expressziójára

Az mRNS szinten leghatékonyabb *SMARCB1* géncsökkentést kiváltó három miRNS (a miR-206, miR-381 és miR-671-5p) *SMARCB1* fehérjére gyakorolt hatását HDF $\alpha$  sejtek transzfektálásával, majd 24 és 48 óra után a sejteken végzett immuncitokémiával vizsgáltuk. *SMARCB1* intranukleáris negativitással rendelkező

sejteket a miR-206 transzfektánsok (22c. ábra), illetve a miR-206/671-5p és a miR-206/381 ko-transzfektánsok (23c és d. ábra) 48 órás kísérletei esetén figyelhattunk meg. A transzfektánsok között 20-60%-os arányban maradtak SMARCB1 fehérje expressziójukat megőrző sejtek, amit a tranziens transzfekciós hatékonyság körülbelül 85 %-os arányának és a fehérje megújulásának („turnover”-ének) tulajdonítottunk. A SMARCB1 protein becsült *in vitro* féléletideje körülbelül 30 órára tehető a Protparam algoritmus (<http://web.expasy.org/protparam/>) fehérje analízise szerint. A nem transzfektált és a negatív kontroll miRNS-sel transzfektált sejtek 100 %-a SMARCB1 pozitív immunfestéssel bírt (22a, b. és 23a, b. ábrák).



**22. Ábra:** SMARCB1 immuncitokémiai festés a kontroll nem transzfektált (a; 40x nagyítás), a negatív kontroll miRNS-sel (b; 40x nagyítás), valamint a miR-206-tal (c; 40x nagyítás) transzfektált HDF $\alpha$  sejteken.



**23. Ábra:** SMARCB1 immuncitokémiai festés a kontroll nem transzfektált (**a**; 20x nagyítás), a negatív kontroll miRNS-sel transzfektált (**b**; 20x nagyítás), valamint a miR-206/671-5p-vel (**c**; 20x nagyítás) és a miR-206/381-gyel (**d**; 20x nagyítás) ko-transzfektált HDFA sejteken.

## 7. MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmányunkban a *SMARCB1* tumorszupresszor gén genetikai státuszát, mRNS és fehérje szintű expresszióját, valamint epigenetikai érintettségét vizsgáltuk egy ritka lágyrész daganat, az epithelioid sarcoma esetében.

Az epigenetikai folyamatok megváltozásai magyarázatot adhatnak a daganatos megbetegedések jellegzetes sajátosságaira és ugyanolyan hatások kiváltását érhetik el, mint a genetikai károsodások. Az egyik legjobb példa erre, a malignus rhabdoid tumor és az epithelioid sarcoma karcinogenezisének összevetése, mivel mindkettő esetében ugyanannak a *SMARCB1* fehérjének az expresszió elvesztése szerepel, de míg a rhabdoid tumorokban genetikai, addig az epithelioid sarcomákban epigenetikai változások állnak a háttérben. Az epigenetikai mechanizmusok megváltozásai általánosan három szinten, a DNS, az RNS és a fehérjék szintjén befolyásolhatják a sejtműködést, s ezzel a genetikai változásokkal, a mutációkkal megegyező hatásokat eredményezhetnek. A szupresszor génekben a promóter régiókon belüli DNS hipermetiláció és az EZH2 metiltranszferáz túlműködése által katalizált hiszton metilációk a karcinogenezis és sarcomagenezis jól ismert és széleskörűen vizsgált mozgatórugói.

A *SMARCB1* gén promóter régiója számos CpG szigettel rendelkezik, ezzel lehetséges helyét szolgáltatva a transzkripció inaktivációját indukáló hipermetiláció mechanizmusának. Vizsgálataink első felében arra kerestük választ, vajon a DNS hipermetilációja vagy az EZH2 mediálta hiszton H3K27 trimetilációja okozza-e a *SMARCB1* fehérje expresszió hiányát epithelioid sarcomában.

A *SMARCB1* gén biallélikus károsodását és az ennek következtében tapasztalt sejtmagi fehérje expresszió vesztését elsőként malignus rhabdoid tumorokban ismerték fel 1990-ben és erre a daganatra specifikus és karakterisztikus jellegzetességnek gondolták [116]. Valamivel később azonban kiderült, hogy a *SMARCB1* fehérje expresszió hiánya jellemző lehet számos más lágyrész tumorra, köztük az epithelioid sarcomára is. Utóbbi daganattípusban az esetek körülbelül 90%-a *SMARCB1* sejtmagi negativitással rendelkezik. Ugyanakkor arra is fény derült, hogy az epithelioid sarcomák többségében a *SMARCB1* génben nincsenek biallélikus mutációk. Ezek az eredmények epigenetikai folyamatok érintettségét sugallták ebben a lágyrész sarcomában.



Tanulmányunk első lépése az volt, hogy a SMARCB1 negatív immunfestésű epithelioid sarcomákat kiválogassuk, majd ezek közül a tumorok közül kiszűrjük a genetikailag biallélikusan károsodott eseteket. Összesen 31 (86%) SMARCB1 negatív epithelioid sarcomát találtunk melyek közül hat (19%) eset mutatott biallélikus eltéréseket. Így a fennmaradó 25 daganat metilációs analízisét végezhetjük el. A kapott eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal, kivéve a biallélikusan károsodott esetek arányát, ami az esetünkben valamivel magasabb, mint azt Kohashi és mtsai. leírták [27]. Ez talán magyarázható azzal a ténnyel, hogy vizsgálatunk mindössze a harmadik tanulmány ebben a tekintetben, ezért összehasonlítás célra sok irodalmi adat nem is állt rendelkezésünkre.

A *SMARCB1* gén promóter metilációs státuszával foglalkozó publikációs adatok száma szintén limitált. Mindössze egyetlen kutatócsoport vizsgálta a *SMARCB1* promóterének metilációját malignus rhabdoid tumorokban és közleményükben leírták, hogy a gén promótere hipermetilációt nem mutatott az említett daganatban [117]. Pozitív kontrollnak, biológiai kontroll minta hiányában, kémiai indukáltunk DNS hipermetilációt a primereink tesztelésére. Meglepetésünkre, a vizsgált 25 epithelioid sarcoma egyikében sem találtuk a *SMARCB1* promóter hipermetilációját [112]. A metilációs analízishez a *SMARCB1* gén 600 bázispár hosszú, CpG szigetekben gazdag DNS szekvenciáját választottuk, amely a 22-es kromoszóma 24129097–24129696-os pozíciójára lokalizált az UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) online alkalmazás szerint. Ez a gén promóter régiója, ami átfedésben van az első exon szekvenciájával is. Összesen 14 nem metilált és metilált specifikus primer párt terveztünk, melyek közül az utóbbiak a CpG szigetek körülbelül 40%-át fedik le a promóterben. Általában ennél kevesebb vagy csak egy-egy metilált és nem metilált specifikus primer pár használata elegendő a metiláció kimutatásához, ahogy ezt számos közleményben MSP módszerhez alkalmazták [118, 119]. A kimutatott metiláció hiánya a *SMARCB1* promóterében sugallta más, nem DNS szintű epigenetikai mechanizmus szerepét, mint pl. a hiszton metilációját.

Az EZH2 a PRC2 fehérje komplex enzimatikusan aktív komponense, ami a lizin 27 trimetilációját katalizálja a hármas hisztonon (H3K27me3), ezáltal represszív állapotot, gének transzkripciójának gátolódását eredményezve. Az EZH2 overexpressziót és a H3K27me3 epigenetikai marker meglétét immunhisztokémia

módszerrel vizsgáltuk a 36 epithelioid sarcoma mintákon és egyik mechanizmust/markert sem azonosítottuk a tumor általános sajátosságaként [112]. Az EZH2 reakciók értékelésében az átlagos pontérték 2,97-nek adódott, ami azt jelenti, hogy az epithelioid sarcomák többsége EZH2 negatív. Mindösszesen három daganat (mindegyik proximális típusú) kapta a legmagasabb hatos értéket. Erre magyarázatul szolgálhat, hogy az EZH2 overexpressziója korrelációt mutat az előrehaladott daganatos progresszióval és a tumorok agresszív viselkedésével. A proximális típusú epithelioid sarcoma prognosztikai szempontból pedig sokkal előnytelenebb a disztális típusnál [3]. Az erős EZH2 pozitivitás tehát nagyon ritka immunfenotípusos tulajdonsága az epithelioid sarcomának. Ezzel ellentétben, az EZH2 rendszerint erősen pozitív a legtöbb ún. blasztos tumorban, mint pl neuroblastoma, Ewing sarcoma, alveoláris rhabdomyosarcoma, malignus rhabdoid tumor [114, 120-122]. De ezekben a daganatokban intakt a *SMARCB1* expresszió, kivéve a rhabdoid tumorokat, melyekben a gén genetikai károsodása ismeretes. Cao Q és mtsai. arról számoltak be, hogy az *E-cadherin* tumorszupresszor gén EZH2 általi repressziója összefüggésbe hozható számos carcinoma agresszivitásával [123]. Az azonban, hogy milyen más gének működése gátolódik a különböző daganatokban az EZH2-funkció következtében, továbbra sem tisztázott, de úgy tűnik, a *SMARCB1* gén ebben nem érintett. Vizsgálatunk képviselte az első tanulmányt, melyben az EZH2 expressziót epithelioid sarcomák nagyobb sorozatán is megvizsgálták. Yamaga és mtsai. egy közleményükben 104 lágyrésztumor között 5 epithelioid sarcomát vizsgáltak, melyeket 16%-os átlagos EZH2 „labeling index”-szel (ami az EZH2 pozitív sejtek százalékos megoszlását jelezte) jellemezték [124]. A H3K27 trimetilációját az EZH2-n kívül más lizin metiltranszferázok, pl. az NSD („nuclear receptor binding SET domain”) fehérje család tagjai is katalizálhatják [125]. Ezért lényeges volt a H3K27me<sub>3</sub> jelenlétének, mint az EZH2 mediált hiszton metiláció funkciós bizonyítékának a vizsgálata, ami szintén negatív immunhisztokémiai eredményeket hozott az epithelioid sarcomákban. Mivel egyik célul tűzött DNS szintű epigenetikai folyamattal sem tudtuk bizonyítani a *SMARCB1* gén inaktivációját, ezért következő lépésnek az mRNS szintű vizsgálatokat végeztük el.

Az mRNS expressziós qRT-PCR kísérletekhez megfelelő minőségű RNS templátot 16 epithelioid sarcoma szöveti blokkjából nyertünk. A PCR eredményeként a tumorokban alacsony, de variábilis *SMARCB1* mRNS szintet kaptunk, attól függően,

hogy a minta milyen normál szövet-tumor aránnyal rendelkezett. Azt nem tudtuk, hogy magukban a tumorsejtekben ez a *SMARCB1* mRNS expresszió teljes hiányát vagy alacsony szintű expresszióját jelenti. Ennek kiderítésére hét esetet, nagyon alacsony és magasabb mRNS szintet mutatókat egyaránt, választottunk lézer mikrodisszekcióra. Az elkülönítetten izolált *SMARCB1* immunnegatív epithelioid sarcoma tumorsejtekben *SMARCB1* mRNS expressziót nem detektáltunk, ellentétben a *SMARCB1* pozitív normál sejtekkel [112]. A *SMARCB1* transzkriptum hiánya azt is jelenti, hogy sem normális, sem megváltozott fehérje nem képződhet, így a fehérje szintű epigenetikai változások, mint pl. az ubikvitinációt követő protein degradáció szerepe kizárható.

Ezek alapján felvetődött az RNS interferencia lehetősége, konkrétan az, hogy specifikus miRNS-ek a *SMARCB1* mRNS repressziójában, hasításában vehetnek részt. Különböző gének miRNS-ek általi csendesítése következtében kialakult csökkent vagy hiányzó mRNS expresszió jól ismert mechanizmus különféle tumoros megbetegedésekben [126]. Sőt a miRNS-ek jelentősége a daganatok képződésében már nem kérdés, egyre több irodalmi adattal rendelkezünk ezeknek a kis molekuláknak az expressziójáról számos tumortípus esetén. A miRNS-ek releváns szerepére több lágyszarcoma biológiájában rámutattak már [127], a közelmúltban publikáltak pl. rhabdomyosarcomával [128-130], liposarcomával [131], osteosarcomával [132], angiosarcomával [133], Ewing sarcomával [134] és synoviális sarcomával [135] kapcsolatos eredményeket. Azonban a mai napig nincsenek adatok a miRNS expresszióról epithelioid sarcomában. Egy 2013-as tanulmányban Sullivan és mtsai. arról számoltak be, hogy az epithelioid sarcomák magas százalékban (83%-ban) biallélikusan deletált *SMARCB1* génnel rendelkeznek [113]. Emiatt validálnunk kellett a genetikai eltérésekkel kapcsolatos korábbi, már publikált FISH eredményeinket. Ehhez öt epithelioid sarcoma (három *SMARCB1* monoallelikusan deletált és kettő *SMARCB1* vad típusú) lézer mikrodisszekált tumorsejtjeiben a *SMARCB1* gén összes, kilenc exonját kimutattuk, azok delécióját igazolni nem tudtuk. Mivel korábban ezeknek a mintáknak a szekvenálása vad típusú *SMARCB1* gént eredményezett, a biallélikus deléció és/vagy mutáció lehetőségét kizártuk. A Sullivan és mtsai. tanulmányában közölt ellentmondás okaként a metodikák különbözőségét hozhatjuk fel. Sullivan és mtsai. vizsgálataikhoz az ún. MLPA, vagyis „multiplex ligációfüggő próba amplifikáció” módszerét alkalmazták és nem pusztán tumorsejteket, hanem teljes

szöveti blokkokból származó, normál szövetet is tartalmazó anyagokat használtak, ami tovább nehezíti relatív összehasonlításra alapuló eredményük interpretálását. Kissé furcsának tűnik az amerikai tanulmányban, hogy a 19 epithelioid sarcoma archivált anyagából, csak 12-ből (63%) tudtak a kísérlethez megfelelő DNS-t kinyerni. Továbbá érdekesnek tartottuk azt, hogy nem írták, milyen minimális tumor százalék szükséges az eredmények elfogadhatóságához, valamint cikkükben az MLPA eredményét feltüntető kép is megkérdőjelezhető. A bemutatott ábra egy domináns tumorminta heterozigóta eredményének is megfelelne, hisz a *SMARCB1* relatív csúcs arányok 0,5 köré (kevésbé az alá és fölé) esnek. Homozigóta delécióra célszerűbb lett volna olyan képet mutatni, ahol az érték biztosan 0,5 alá megy. Ettől függetlenül tervezzük, hogy a saját mintáinkon elvégezzük az MLPA vizsgálatot is, hogy ezzel közvetlenebb összehasonlítást nyerjünk a két tanulmány között.

Új eredményként a miR-206, miR-381, miR-671-5p és a miR-765 miRNS-ek szignifikáns overexpresszióját mutattuk ki abban a 25 epithelioid sarcomában, amelyekben biállélikus mutációkat nem találtunk [136]. Míg a biállélikusan deletált epithelioid sarcomákban és a rhabdoid tumorokban a fenti miRNS-eknek nem volt emelkedett az expressziója.

Érdekesnek tartottuk, hogy az epithelioid sarcomában legmagasabb szintű (10,12-szeres) expressziót mutató miR-765 nem bizonyult hatékony *SMARCB1* géncsendesítő molekulának a funkcionális *in vitro* vizsgálatok során. Ezzel ellentétben, a miR-206, mely csak 5,7-szeres expresszió emelkedést mutatott, volt képes a legerősebb csendesítő hatást kiváltani [136]. Mindez felhívja a figyelmet a funkcionális tesztek jelentőségére a kutatások során. Funkcionális vizsgálatainkhoz három sejtvonalat transzfektáltunk, mivel biztosak szeretnénk volna lenni abban, hogy a géncsendesítés nemcsak normál humán fibroblasztokon, de sarcoma és carcinoma sejtvonalakon is működik. A tranziens transzfecciót elektroporációval hajtottuk végre, ami egy megbízható és egyben gyors eredményt adó módszert jelentett. A ko-transzfecció kísérletektől azt vártuk volna, hogy a miR-206, miR-381 és miR-671-5p dupla és tripla kombinációi lesznek a leghatékonyabbak a *SMARCB1* csendesítés során. Fontos megjegyezni, hogy az elektroporáció során a reakció térfogatának 10%-át nem haladhatja meg az oldott miRNS-ek térfogata, ez limitálta a miRNS bemérések koncentrációját. A tripla kombinációs kísérleteknél az egyes miRNS koncentrációk a

harmadukra hígultak, ami magyarázhatja miért nem zajlott le RNS interferencia. A dupla kombinációknál is ebbe a problémába ütköztünk, ami ugyan szignifikáns, de gyengébb géncsendesítést okozott, mint amikor csak a miR-206-tal transzfektáltunk. A HT-1080 transzfektánsokban a 48 óra után mért, következetesen kisebb csendesítő hatás azt mutatta, hogy a maximális csendesítéshez 24 óra elegendő. Bár a SMARCB1 fehérje féléletideje 30 óra, ahhoz hogy az RNS interferencia folyamata fehérje szinten is kimutatható legyen a kísérleteinkben 48 óra kellett. Ennyi idő eltelte után sikerült immuncitokémiával kimutatnunk SMARCB1 negatív sejtmagú sejteket a miR-206, a miR-206/671-5p és a miR-206/381 transzfektánsok között.

A miR-206 szerepe különösen érdekes epithelioid sarcomában. A miR-206/miR-133b és a miR-1/miR-133a általánosan úgy ismertek, mint izomszövet specifikus miRNS-ek, ún. myomiR-ek [137] és a miR-1-1/miR-133a-2, miR-1-2/miR-133a-1 és miR-206/miR-133b klasztereket alkotják a humán genom három különböző, 20q13.33, 18q11.2 és 6p12.2 kromoszómális régiójában [138]. A miR-206/miR-133b intergénikus régióban helyezkedik el. A miR-206 expresszióját és funkcióját tekintve hasonlít a miR-1-hez, bár a szekvenciája négy nukleotidban tér el a miR-1-től [138]. A miR-206-tal kapcsolatos publikációkban e miRNS down-regulációját közölték számos daganattípusban, mint pl. tüdő [139], emlő [140], endometrialis carcinomákban [141] és rhabdomyosarcomában [142]. A miR-206 validált target onkogénjeiként szerepelnek az *ESR1* (*oestrogen receptor 1*) [141], a *MET* (*met proto-oncogene*) [142] és a *NOTCH3* (*Notch homolog 3*) gének [143], tehát a miR-206 egyfajta tumorszupresszor miRNS-ként ismeretes. Azonban epithelioid sarcomában a miR-206 overexpressziója jellemző és a miRNS target génje, a *SMARCB1* egy erős tumorszupresszor, ezért ebben a tumorban a miR-206 onkomiRNS-nek fogható fel. Ezt a kétirányú génszabályozási lehetőségét a miR-206-nak eddig nem ismertük, de a miRNS-világ komplexitását figyelembe véve, vagyis amennyi gén lehet egyetlen miRNS célpontja és amennyi miRNS-nek targetje lehet egy gén, nem is annyira meglepő ez a tulajdonság. Lehetséges magyarázatként szolgálhat a miR-206 váratlan funkciójára epithelioid sarcomában, hogy a miR-206 expresszió rendszerint együttesen változik a miR-1 expressziójával, de epithelioid sarcomában a miR-1 expresszió nem mutatott emelkedett szintet a vizsgálataink során sem.

A miR-381 volt a másik felülszabályozott expressziót mutató miRNS az epithelioid sarcoma mintáinkban és közel hasonló *SMARCB1* géncsendesítést indukált, mint a miR-671-5p. A miR-381 a kevésbé tanulmányozott miRNS-ek közé tartozik, de irodalmi adatok támasztják alá down-regulációját tüdő adenocarcinomában és target génjeként az *ID1* (*Inhibitor of Differentiation 1*) gént írták le [144]. Sokkal inkább lényeges, hogy a miR-381 felülregulálódik synovialis sarcomában és célgénjeként a *SMARCA5* szerepel [135]. Ez összhangba hozható az Arnold és mtsai. által közölt eredményekkel, melyek szerint lecsökkent *SMARCB1* immunreaktivitás jellemzi a synovialis sarcomák döntő többségét [145]. Mindezen adatok alapján a miR-381 onko-miRNS funkcióval bírhat epithelioid és synovialis sarcomában egyaránt.

A harmadik, epithelioid sarcomában felülszabályozódott és hatékony géncsendesítést kiváltó miRNS a miR-671-5p volt, de róla releváns irodalmi adatot a tanulmányunkkal kapcsolatosan nem találtunk.

A *SMARCB1* csendesítésben funkcionális aktivitást nem mutató miR-765-tel kapcsolatos, máig megjelent publikációk száma szintúgy limitált. A miR-765 up-regulációját leírták osteosarcomában [146], von Hippel-Lindau szindrómához társult pheochromocytomában [147] és vastagbélrákban [148], azonban a miRNS specifikus funkcióját nem tisztázták.

További kísérleteink irányvonala közt szerepel többek közt annak a kiderítése, hogy más *SMARCB1* deficiens lágyrész sarcomákban megvizsgáljuk a miR-206, miR-381, miR-671-5p és a miR-765 expresszióit. Ezzel feltehetőleg bizonyíthatnánk, hogy a *SMARCB1* epigenetikai szabályozása egy általánosnak mondható vagy inkább daganatspecifikus mechanizmussal működik. A miRNS-ek *in vitro* permanens transzfekeciójával egy stabil RNS interferencia elérése lenne a cél, mely lehetővé tenné e molekulák általános és feltételezetten onkogenikus hatásának tanulmányozását. Végül *in vivo* állatkísérletekkel (a stabil transzfekektáns sejtek állatba oltásával) lehetne megvizsgálni, hogy a miRNS-ek feltételezett tumor-transzformáló hatása önmagában elegendő-e vagy más genetikai és/vagy epigenetikai eltérések szükségesek epithelioid sarcoma kialakulásához.

Összefoglalva, az általunk epithelioid sarcomában meghatározott emelkedett kifejeződésű és a *SMARCB1* tumorszupresszor gént funkcionálisan csendesíteni képes miR-206, miR-381 és miR-671-5p miRNS-ek szerepet játszhatnak a betegség

kialakulásában. Továbbá a miRNS expressziós eredményeink differenciáldiagnosztikai jelentőséggel bírnak a malignus rhabdoid tumor és az epithelioid sarcoma elkülönítésében.

## 8. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

- Az epithelioid sarcomák többségére (81%) nem jellemző a *SMARCB1* tumorszupresszor gén biállélikus genetikai eltérése. Továbbá sem a gén promóter régiójának hipermetilációja, sem az egyik leggyakoribb hiszton metilációs mechanizmus, az EZH2 mediált H3K27 trimetiláció, sem az *EZH2* gén túlfokozott működése nem felelős a *SMARCB1* transzkripció gátlásáért.
- A *SMARCB1* immunnegatív epithelioid sarcoma tumorsejtekben mRNS expresszió nem kimutatható, ezért poszt-transzlációs módosítások sem okozzák a *SMARCB1* fehérje hiányát.
- A *SMARCB1* gén inaktivációjának okaként az RNS interferencia szerepe igazolódott epithelioid sarcomában. Szignifikánsan emelkedett expresszió található a következő négy miRNS esetében: miR-206, miR-381, miR-671-5p és miR-765.
- A miR-206, miR-381 és miR-671-5p, valamint ezen miRNS-ek kombinációi mutatnak funkcionális aktivitást a *SMARCB1* gén csendesítésére.
- A felfedezett epigenetikai szabályozás egy új mechanizmus az epithelioid sarcoma karcinogenezisében: *SMARCB1* tumorszupresszor gént ún. onko-miRNS-ek (miR-206, miR-381, miR-671-5p) szabályozzák, melyek feltehetőleg szerepet játszanak a tumor patogenezésében.
- Eredményeink alapján lehetőség van a malignus rhabdoid tumor és az epithelioid sarcoma (főként a proximális típus) diagnosztikus elkülönítésére.



## 9. 1. ÖSSZEFOGLALÁS

A *SMARCB1* tumorszupresszor gén károsodása a 22-es kromoszóma hosszú karján régóta ismert, de csak mostanában térképezték fel ennek molekuláris mechanizmusait. A *SMARCB1* expresszió hiányát számos tumor típusban leírták, de a *SMARCB1* negatív esetek legnagyobb százalékban a malignus rhabdoid daganatokra és az epithelioid sarcomákra jellemzőek. Az epithelioid sarcoma egy ritka előfordulású és agresszív viselkedésű lágyrész daganat melynek patogenezise teljesen ismeretlen. Két típusa (disztális és proximális) közül főként a proximális epithelioid sarcoma elkülönítése okoz nehézséget más gyengén differenciált carcinomától és epithelioid malignus tumoroktól. A *SMARCB1* gén inaktiváció hátterében a rhabdoid daganatok esetében genetikai sérülés, biallélikus deléció és/vagy mutáció áll. Más lágyrész tumorok esetén, mint pl. az epithelioid sarcoma, annak ellenére, hogy *SMARCB1* negatívak, döntően nem genetikai eltérés, hanem epigenetikai mechanizmus okoz *SMARCB1* funkcióvesztést. Munkacsoportunk azonban kimutatta, hogy sem a gén promóterének hipermetilációja, sem az EZH2 mediálta H3K27 trimetilációja nem felelős a *SMARCB1* transzkripció gátlásáért, valamint a tumorsejtek mikrodisszekcióját követően *SMARCB1* mRNS expresszió sem volt detektálható. Elsőként találtuk meg azokat a miRNS-eket, amelyek epithelioid sarcomában a *SMARCB1* gént onkomiRNS-ként szabályozzák. Szignifikánsan ( $p < 0.001$ ) emelkedett expressziót találtunk a következő négy miRNS esetében: miR-206, miR-381, miR-671-5p és miR-765. Három miRNS, a miR-206, miR-381 és miR-671-5p szignifikánsan csendesítette a *SMARCB1* gént, míg a miR-765 nem bizonyult funkcionálisan aktívnek az *in vitro* kísérletek során. Az RNS interferencia mechanizmusát nemcsak mRNS, hanem fehérje szinten is sikerült igazolnunk transzfekcióval amely a miR-206-tal önmagában és kombinációban a miR-381 és miR-671-5p-vel is sikeres volt. Eredményeink felhasználhatóak lehetnek az epithelioid sarcoma és a malignus rhabdoid tumor differenciáldiagnosztikájában. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a miR-206, miR-381 és miR-671-5p szerepet játszhatnak az epithelioid sarcoma patogenezisében.

## 9. 2. SUMMARY

Damages of the tumour suppressor *SMARCB1* gene on long arm of chromosome 22 has been known for a long while; however the underlying molecular mechanisms have only been identified recently. Loss of *SMARCB1* protein expression has been reported in many tumour types but the highest percentage of *SMARCB1* negative cases are probably malignant rhabdoid tumours and epithelioid sarcomas. Epithelioid sarcoma is a rare soft tissue tumour with aggressive behaviour and unknown pathogenesis. It is difficult to distinguish the proximal type epithelioid sarcoma from other poorly differentiated carcinomas and epithelioid malignant tumours. The *SMARCB1* inactivation in rhabdoid tumours is associated with genetic alterations as biallelic deletion and/or mutation. Despite the *SMARCB1* negativity, in some other soft tissue tumours such as epithelioid sarcoma there is no *SMARCB1* genetic aberration but supposedly epigenetic mechanism can cause the loss of function. Our group found, that neither the gene promoter hypermethylation nor the EZH2 mediated H3K27 trimethylation was responsible for the inhibition of *SMARCB1* transcription and there was no detectable *SMARCB1* mRNA in the laser microdissected tumour cells. We discovered for the first time that *SMARCB1* is regulated by oncomiRNAs in epithelioid sarcoma. We demonstrated a significant ( $p < 0.001$ ) overexpression of four miRNAs in epithelioid sarcomas: miR-206, miR-381, miR-671-5p and miR-765. Three of them, the miR-206, miR-381 and miR-671-5p were functionally capable to significantly silence the *SMARCB1* gene while miR-765 was functionally not active using in vitro experiments. The mechanism of RNA interference was proved both in an mRNA and also in a protein level using transfection with miR-206 alone and with the combinations of miR-206, miR-381 and miR-671-5p. Our results can be useful in the differential diagnostics of malignant rhabdoid tumours and epithelioid sarcomas. Our observations suggest that the miR-206, miR-381 and miR-671-5p may have a role in the pathogenesis of epithelioid sarcoma.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Enzinger FM. (1970) Epithelioid sarcoma. A sarcoma simulating a granuloma or a carcinoma. *Cancer*, 26:1029-1041.
2. Livi L, Shah N, Paiar F, Fisher C, Judson I, Moskovic E, Thomas M, Harmer C. (2003) Treatment of epithelioid sarcoma at the royal marsden hospital. *Sarcoma*, 7:149-152.
3. Casanova M, Ferrari A, Collini P, Bisogno G, Alaggio R, Cecchetto G, Gronchi A, Meazza C, Garaventa A, Di Cataldo A, Carli M. (2006) Epithelioid sarcoma in children and adolescents: a report from the Italian Soft Tissue Sarcoma Committee. *Cancer*, 106:708-717.
4. Rekhi B, Gorad BD, Chinoy RF. (2008) Clinicopathological features with outcomes of a series of conventional and proximal-type epithelioid sarcomas, diagnosed over a period of 10 years at a tertiary cancer hospital in India. *Virchows Arch*, 453:141-153.
5. Gasparini P, Facchinetti F, Boeri M, Lorenzetto E, Livio A, Gronchi A, Ferrari A, Massimino M, Spreafico F, Giangaspero F, Forni M, Maestro R, Alaggio R, Pilotti S, Collini P, Modena P, Sozzi G. (2011) Prognostic determinants in epithelioid sarcoma. *Eur J Cancer*, 47:287-295.
6. Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Umeda T, Yokoyama R, Hirohashi S. (2001) Proximal-type epithelioid sarcoma: a clinicopathologic study of 20 cases. *Mod Pathol*, 14:655-663.
7. Halling AC, Wollan PC, Pritchard DJ, Vlasak R, Nascimento AG. (1996) Epithelioid sarcoma: a clinicopathologic review of 55 cases. *Mayo Clin Proc*, 71:636-642.
8. Evans HL, Baer SC. (1993) Epithelioid sarcoma: a clinicopathologic and prognostic study of 26 cases. *Semin Diagn Pathol*, 10:286-291.
9. Baratti D, Pennacchioli E, Casali PG, Bertulli R, Lozza L, Olmi P, Collini P, Radaelli S, Fiore M, Gronchi A. (2007) Epithelioid sarcoma: prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution. *Ann Surg Oncol*, 14:3542-3551.

10. Spillane AJ, Thomas JM, Fisher C. (2000) Epithelioid sarcoma: the clinicopathological complexities of this rare soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol*, 7:218-225.
11. Chbani L, Guillou L, Terrier P, Decouvelaere AV, Gregoire F, Terrier-Lacombe MJ, Ranchere D, Robin YM, Collin F, Freneaux P, Coindre JM. (2009) Epithelioid sarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 106 cases from the French sarcoma group. *Am J Clin Pathol*, 131:222-227.
12. Izumi T, Oda Y, Hasegawa T, Nakanishi Y, Iwasaki H, Sonobe H, Goto H, Kusakabe H, Takahira T, Kobayashi C, Kawaguchi K, Saito T, Yamamoto H, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. (2006) Prognostic significance of dysadherin expression in epithelioid sarcoma and its diagnostic utility in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. *Mod Pathol*, 19:820-831.
13. Fisher C. (2006) Epithelioid sarcoma of Enzinger. *Adv Anat Pathol*, 13:114-121.
14. Babu R, Karikari IO, Cummings TJ, Gottfried ON, Bagley CA. (2013) Treatment and outcomes of epithelioid sarcoma of the spine. *J Clin Neurosci*, 20:1342-1345.
15. Wolf PS, Flum DR, Tanas MR, Rubin BP, Mann GN. (2008) Epithelioid sarcoma: the University of Washington experience. *Am J Surg*, 196:407-412.
16. Guillou L, Wadden C, Coindre JM, Krausz T, Fletcher CD. (1997) "Proximal-type" epithelioid sarcoma, a distinctive aggressive neoplasm showing rhabdoid features. Clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of a series. *Am J Surg Pathol*, 21:130-146.
17. Dei Tos AP, Wagner AJ, Modena P, Comandone A, Leyvraz S. (2009) Epithelioid soft tissue tumors. *Semin Oncol*, 36:347-357.
18. Beckwith JB, Palmer NF. (1978) Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer*, 41:1937-1948.
19. Tsuneyoshi M, Daimaru Y, Hashimoto H, Enjoji M. (1987) The existence of rhabdoid cells in specified soft tissue sarcomas. Histopathological, ultrastructural and immunohistochemical evidence. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 411:509-514.

20. Ueyama T, Nagai E, Yao T, Tsuneyoshi M. (1993) Vimentin-positive gastric carcinomas with rhabdoid features. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*, 17:813-819.
21. Miettinen M, Fanburg-Smith JC, Virolainen M, Shmookler BM, Fetsch JF. (1999) Epithelioid sarcoma: an immunohistochemical analysis of 112 classical and variant cases and a discussion of the differential diagnosis. *Hum Pathol*, 30:934-942.
22. Oshiro Y, Shiratsuchi H, Oda Y, Toyoshima S, Tsuneyoshi M. (2000) Rhabdoid features in leiomyosarcoma of soft tissue: with special reference to aggressive behavior. *Mod Pathol*, 13:1211-1218.
23. Oshiro Y, Shiratsuchi H, Tamiya S, Oda Y, Toyoshima S, Tsuneyoshi M. (2000) Extraskelletal Myxoid Chondrosarcoma with Rhabdoid Features, with Special Reference to Its Aggressive Behavior. *Int J Surg Pathol*, 8:145-152.
24. Vogel AM, Gown AM, Caughlan J, Haas JE, Beckwith JB. (1984) Rhabdoid tumors of the kidney contain mesenchymal specific and epithelial specific intermediate filament proteins. *Lab Invest*, 50:232-238.
25. Miettinen M. (2014) Immunohistochemistry Of Soft Tissue Tumors - Review With Emphasis On Ten Markers. *Histopathology*, 64:101-118.
26. Modena P, Lualdi E, Facchinetti F, Galli L, Teixeira MR, Pilotti S, Sozzi G. (2005) SMARCB1/INI1 tumor suppressor gene is frequently inactivated in epithelioid sarcomas. *Cancer Res*, 65:4012-4019.
27. Kohashi K, Izumi T, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Taguchi T, Iwamoto Y, Hasegawa T, Tsuneyoshi M. (2009) Infrequent SMARCB1/INI1 gene alteration in epithelioid sarcoma: a useful tool in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. *Hum Pathol*, 40:349-355.
28. Armah HB, Parwani AV. (2009) Epithelioid sarcoma. *Arch Pathol Lab Med*, 133:814-819.
29. Lualdi E, Modena P, Debiec-Rychter M, Pedeutour F, Teixeira MR, Facchinetti F, Dagrada GP, Pilotti S, Sozzi G. (2004) Molecular cytogenetic characterization of proximal-type epithelioid sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 41:283-290.

30. Quezado MM, Middleton LP, Bryant B, Lane K, Weiss SW, Merino MJ. (1998) Allelic loss on chromosome 22q in epithelioid sarcomas. *Hum Pathol*, 29:604-608.
31. Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB. (2002) Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*, 8:3461-3467.
32. Hornick JL, Dal Cin P, Fletcher CD. (2009) Loss of INI1 expression is characteristic of both conventional and proximal-type epithelioid sarcoma. *Am J Surg Pathol*, 33:542-550.
33. Kadonaga JT. (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell*, 92:307-313.
34. Cairns BR. (1998) Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem Sci*, 23:20-25.
35. de la Serna IL, Ohkawa Y, Imbalzano AN. (2006) Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat Rev Genet*, 7:461-473.
36. Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE. (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell*, 3:247-253.
37. Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR. (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron*, 55:201-215.
38. Neigeborn L, Carlson M. (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 108:845-858.
39. Peterson CL, Dingwall A, Scott MP. (1994) Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:2905-2908.
40. Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, Goff SP. (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science*, 266:2002-2006.

41. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. (2002) Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*, 79:464-470.
42. Geng F, Cao Y, Laurent BC. (2001) Essential roles of Snf5p in Snf-Swi chromatin remodeling in vivo. *Mol Cell Biol*, 21:4311-4320.
43. Vries RG, Bezrookove V, Zuijderduijn LM, Kia SK, Houweling A, Oruetxebarria I, Raap AK, Verrijzer CP. (2005) Cancer-associated mutations in chromatin remodeler hSNF5 promote chromosomal instability by compromising the mitotic checkpoint. *Genes Dev*, 19:665-670.
44. Imbalzano AN, Jones SN. (2005) Snf5 tumor suppressor couples chromatin remodeling, checkpoint control, and chromosomal stability. *Cancer Cell*, 7:294-295.
45. Betz BL, Strobeck MW, Reisman DN, Knudsen ES, Weissman BE. (2002) Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G1 arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB. *Oncogene*, 21:5193-5203.
46. Chai J, Charboneau AL, Betz BL, Weissman BE. (2005) Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates p21CIP/WAF1 and p16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells. *Cancer Res*, 65:10192-10198.
47. Kia SK, Gorski MM, Giannakopoulos S, Verrijzer CP. (2008) SWI/SNF mediates polycomb eviction and epigenetic reprogramming of the INK4b-ARF-INK4a locus. *Mol Cell Biol*, 28:3457-3464.
48. Isakoff MS, Sansam CG, Tamayo P, Subramanian A, Evans JA, Fillmore CM, Wang X, Biegel JA, Pomeroy SL, Mesirov JP, Roberts CW. (2005) Inactivation of the Snf5 tumor suppressor stimulates cell cycle progression and cooperates with p53 loss in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:17745-17750.
49. Klochender-Yeivin A, Picarsky E, Yaniv M. (2006) Increased DNA damage sensitivity and apoptosis in cells lacking the Snf5/Ini1 subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol*, 26:2661-2674.

50. Medjkane S, Novikov E, Versteeg I, Delattre O. (2004) The tumor suppressor hSNF5/INI1 modulates cell growth and actin cytoskeleton organization. *Cancer Res*, 64:3406-3413.
51. Caramel J, Quignon F, Delattre O. (2008) RhoA-dependent regulation of cell migration by the tumor suppressor hSNF5/INI1. *Cancer Res*, 68:6154-6161.
52. Morozov A, Lee SJ, Zhang ZK, Cimica V, Zagzag D, Kalpana GV. (2007) INI1 induces interferon signaling and spindle checkpoint in rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*, 13:4721-4730.
53. Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O. (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, 394:203-206.
54. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. (1999) Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res*, 59:74-79.
55. Hollmann TJ, Hornick JL. (2011) INI1-deficient tumors: diagnostic features and molecular genetics. *Am J Surg Pathol*, 35:e47-63.
56. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69:915-926.
57. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99:247-257.
58. Jones PL, Wolffe AP. (1999) Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol*, 9:339-347.
59. Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. (2002) Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, 30:73-76.
60. Li E, Beard C, Jaenisch R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366:362-365.
61. Laird PW, Jaenisch R. (1996) The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet*, 30:441-464.



62. Robertson KD, Jones PA. (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21:461-467.
63. Guitton AE, Berger F. (2005) Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants. *Int J Dev Biol*, 49:707-716.
64. Swigut T, Wysocka J. (2007) H3K27 demethylases, at long last. *Cell*, 131:29-32.
65. Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116:281-297.
66. Strahl BD, Allis CD. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403:41-45.
67. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419:407-411.
68. Chi P, Allis CD, Wang GG. (2010) Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 10:457-469.
69. Albert M, Helin K. (2010) Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 21:209-220.
70. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419:624-629.
71. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:11606-11611.
72. Visser HP, Gunster MJ, Kluin-Nelemans HC, Manders EM, Raaphorst FM, Meijer CJ, Willemze R, Otte AP. (2001) The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, 112:950-958.

73. Changchien YC, Tatrai P, Papp G, Sapi J, Fonyad L, Szendroi M, Papai Z, Sapi Z. (2012) Poorly differentiated synovial sarcoma is associated with high expression of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2). *J Transl Med*, 10:216.
74. Chase A, Cross NC. (2011) Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res*, 17:2613-2618.
75. Herman JG, Baylin SB. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349:2042-2054.
76. Belinsky SA. (2004) Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 4:707-717.
77. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*, 24:132-138.
78. Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S, Namiki T, Nobori T, Kaneko Y. (2000) Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 120:91-98.
79. Nestheide S, Bridge JA, Barnes M, Frayer R, Sumegi J. (2013) Pharmacologic inhibition of epigenetic modification reveals targets of aberrant promoter methylation in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 60:1437-1446.
80. Sievers S, Fritsch C, Lehnhardt M, Zahn S, Kutzner N, Kuhnen C, Muller O. (2006) Hypermethylation of the APC promoter but lack of APC mutations in myxoid/round-cell liposarcoma. *Int J Cancer*, 119:2347-2352.
81. Chen K, Rajewsky N. (2006) Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet*, 38:1452-1456.
82. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120:15-20.
83. Plasterk RH. (2002) RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 296:1263-1265.

84. Ying SY, Chang CP, Lin SL. (2010) Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. *Methods Mol Biol*, 629:205-237.
85. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294:853-858.
86. Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW. (2011) Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17~92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Mol Endocrinol*, 25:409-420.
87. Pontes O, Pikaard CS. (2008) siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev*, 18:197-203.
88. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9:277-279.
89. Griffiths-Jones S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, 32:D109-111.
90. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435:834-838.
91. Voorhoeve PM, Agami R. (2007) Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta*, 1775:274-282.
92. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:15524-15529.
93. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 24:4677-4684.
94. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. (2005) The

- role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:19075-19080.
95. Nana-Sinkam SP, Geraci MW. (2006) MicroRNA in lung cancer. *J Thorac Oncol*, 1:929-931.
  96. Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW. (2008) Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47:897-907.
  97. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, Ogawa R, Harata K, Fujii Y. (2009) microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol*, 34:537-542.
  98. Dahiya N, Morin PJ. (2010) MicroRNAs in ovarian carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 17:F77-89.
  99. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. (2008) MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*, 122:969-977.
  100. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. (2006) A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:3584-3591.
  101. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 353:1793-1801.
  102. Pacheco M, Nielsen TO. (2012) Histone deacetylase 1 and 2 in mesenchymal tumors. *Mod Pathol*, 25:222-230.
  103. Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Izumi T, Ohta S, Taguchi T, Suita S, Tsuneyoshi M. (2007) Highly aggressive behavior of malignant rhabdoid tumor: a special reference to SMARCB1/INI1 gene alterations using molecular genetic analysis including quantitative real-time PCR. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133:817-824.

104. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463-5467.
105. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 2:e363.
106. Wang X. (2008) miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, 14:1012-1017.
107. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115:787-798.
108. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10:1507-1517.
109. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39:1278-1284.
110. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25:402-408.
111. Lushnikova T, Knuutila S, Miettinen M. (2000) DNA copy number changes in epithelioid sarcoma and its variants: a comparative genomic hybridization study. *Mod Pathol*, 13:1092-1096.
112. Papp G, Changchien YC, Peterfia B, Pecszenka L, Krausz T, Stricker TP, Khor A, Donner L, Sapi Z. (2013) SMARCB1 protein and mRNA loss is not caused by promoter and histone hypermethylation in epithelioid sarcoma. *Mod Pathol*, 26:393-403.
113. Sullivan LM, Folpe AL, Pawel BR, Judkins AR, Biegel JA. (2013) Epithelioid sarcoma is associated with a high percentage of SMARCB1 deletions. *Mod Pathol*, 26:385-392.
114. Venneti S, Le P, Martinez D, Xie SX, Sullivan LM, Rorke-Adams LB, Pawel B, Judkins AR. (2011) Malignant rhabdoid tumors express stem cell factors, which relate to the expression of EZH2 and Id proteins. *Am J Surg Pathol*, 35:1463-1472.
115. Sarver AL, Subramanian S. (2012) Competing endogenous RNA database. *Bioinformatics*, 8:731-733.

116. Handgretinger R, Kimmig A, Koscielnak E, Schmidt D, Rudolph G, Wolburg H, Paulus W, Schilbach-Stueckle K, Ottenlinger C, Menrad A, et al. (1990) Establishment and characterization of a cell line (Wa-2) derived from an extrarenal rhabdoid tumor. *Cancer Res*, 50:2177-2182.
117. Zhang F, Tan L, Wainwright LM, Bartolomei MS, Biegel JA. (2002) No evidence for hypermethylation of the hSNF5/INI1 promoter in pediatric rhabdoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 34:398-405.
118. Skiriute D, Vaitkiene P, Saferis V, Asmoniene V, Skauminas K, Deltuva VP, Tamasauskas A. (2012) MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. *BMC Cancer*, 12:218.
119. Wang D, Chen Q, Zhang C, Ren F, Li T. (2012) DNA hypomethylation of the COX-2 gene promoter is associated with up-regulation of its mRNA expression in eutopic endometrium of endometriosis. *Eur J Med Res*, 17:12.
120. Wang C, Liu Z, Woo CW, Li Z, Wang L, Wei JS, Marquez VE, Bates SE, Jin Q, Khan J, Ge K, Thiele CJ. (2012) EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res*, 72:315-324.
121. Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Staeger MS, Muller-Tidow C, Richter GH. (2009) Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle*, 8:1991-1996.
122. Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rossler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Lowel D, von Luettichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Muller-Tidow C, Burdach S. (2009) EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:5324-5329.
123. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Yu J, Kleer CG, Varambally S, Chinnaiyan AM. (2008) Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene*, 27:7274-7284.

124. Yamaga K, Osaki M, Kidani K, Shomori K, Yoshida H, Ito H. (2008) High expression of enhancer of zeste homologue 2 indicates poor prognosis in patients with soft tissue sarcomas. *Mol Med Rep*, 1:633-639.
125. Li Y, Trojer P, Xu CF, Cheung P, Kuo A, Drury WJ, 3rd, Qiao Q, Neubert TA, Xu RM, Gozani O, Reinberg D. (2009) The target of the NSD family of histone lysine methyltransferases depends on the nature of the substrate. *J Biol Chem*, 284:34283-34295.
126. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. (2007) MicroRNAs and cancer. *Apmis*, 115:1090-1106.
127. Subramanian S, Kartha RV. (2012) MicroRNA-mediated gene regulations in human sarcomas. *Cell Mol Life Sci*, 69:3571-3585.
128. Armeanu-Ebinger S, Herrmann D, Bonin M, Leuschner I, Warmann SW, Fuchs J, Seitz G. (2012) Differential expression of miRNAs in rhabdomyosarcoma and malignant rhabdoid tumor. *Exp Cell Res*, 318:2567-2577.
129. Li L, Sarver AL, Alamgir S, Subramanian S. (2012) Downregulation of microRNAs miR-1, -206 and -29 stabilizes PAX3 and CCND2 expression in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest*, 92:571-583.
130. Missiaglia E, Shepherd CJ, Patel S, Thway K, Pierron G, Pritchard-Jones K, Renard M, Sciot R, Rao P, Oberlin O, Delattre O, Shipley J. (2010) MicroRNA-206 expression levels correlate with clinical behaviour of rhabdomyosarcomas. *Br J Cancer*, 102:1769-1777.
131. Borjigin N, Ohno S, Wu W, Tanaka M, Suzuki R, Fujita K, Takanashi M, Oikawa K, Goto T, Motoi T, Kosaka T, Yamamoto K, Kuroda M. (2012) TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 427:355-360.
132. Chen L, Wang Q, Wang GD, Wang HS, Huang Y, Liu XM, Cai XH. (2013) miR-16 inhibits cell proliferation by targeting IGF1R and the Raf1-MEK1/2-ERK1/2 pathway in osteosarcoma. *FEBS Lett*, 587:1366-1372.
133. Italiano A, Thomas R, Breen M, Zhang L, Crago AM, Singer S, Khanin R, Maki RG, Mihailovic A, Hafner M, Tuschl T, Antonescu CR. (2012) The miR-17-92

- cluster and its target THBS1 are differentially expressed in angiosarcomas dependent on MYC amplification. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:569-578.
134. Dylla L, Moore C, Jedlicka P. (2013) MicroRNAs in Ewing Sarcoma. *Front Oncol*, 3:65.
  135. Hisaoka M, Matsuyama A, Nagao Y, Luan L, Kuroda T, Akiyama H, Kondo S, Hashimoto H. (2011) Identification of altered MicroRNA expression patterns in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 50:137-145.
  136. Papp G, Krausz T, Stricker TP, Szendroi M, Sapi Z. (2014) SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels. *Genes Chromosomes Cancer*, 53:168-176.
  137. Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D. (2010) MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 42:1252-1255.
  138. Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. (2012) microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*, 3:9-21.
  139. Moriya Y, Nohata N, Kinoshita T, Mutallip M, Okamoto T, Yoshida S, Suzuki M, Yoshino I, Seki N. (2012) Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel molecular networks in lung squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*, 57:38-45.
  140. Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. (2008) miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res*, 68:5004-5008.
  141. Chen X, Yan Q, Li S, Zhou L, Yang H, Yang Y, Liu X, Wan X. (2012) Expression of the tumor suppressor miR-206 is associated with cellular proliferative inhibition and impairs invasion in ERalpha-positive endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 314:41-53.
  142. Taulli R, Bersani F, Foglizzo V, Linari A, Vigna E, Ladanyi M, Tuschl T, Ponzetto C. (2009) The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. *J Clin Invest*, 119:2366-2378.



143. Song G, Zhang Y, Wang L. (2009) MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation. *J Biol Chem*, 284:31921-31927.
144. Rothschild SI, Tschan MP, Jaggi R, Fey MF, Gugger M, Gautschi O. (2012) MicroRNA-381 represses ID1 and is deregulated in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 7:1069-1077.
145. Arnold MA, Arnold CA, Li G, Chae U, El-Etriby R, Lee CC, Tsokos M. (2013) A unique pattern of INI1 immunohistochemistry distinguishes synovial sarcoma from its histologic mimics. *Hum Pathol*, 44:881-887.
146. Dai N, Zhong ZY, Cun YP, Qing Y, Chen C, Jiang P, Li MX, Wang D. (2013) Alteration of the microRNA expression profile in human osteosarcoma cells transfected with APE1 siRNA. *Neoplasma*, 60:384-394.
147. Tombol Z, Eder K, Kovacs A, Szabo PM, Kulka J, Liko I, Zalatnai A, Racz G, Toth M, Patocs A, Falus A, Racz K, Igaz P. (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol*, 23:1583-1595.
148. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, Singh VK, D'Incalci M, De Placido S, Pepe S. (2012) A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 83:1113-1119.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 11. 1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Papp G**, Krausz T, Stricker TP, Szendrői M, Sápi Z. (2014) SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels. *Genes Chromosomes Cancer*, 53(2):168-76.

**IF.: 3,546**

2. **Papp G**, Changchien YC, Péterfia B, Pecsenska L, Krausz T, Stricker TP, Khor A, Donner L, Sápi Z. (2013) SMARCB1 protein and mRNA loss is not caused by promoter and histone hypermethylation in epithelioid sarcoma. *Mod Pathol*, 26(3):393-403.

**IF.: 5,253**

### 11. 2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Changchien YC, Tátrai P, **Papp G**, Sápi J, Fónyad L, Szendrői M, Pápai Z, Sápi Z. (2012) Poorly differentiated synovial sarcoma is associated with high expression of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2). *J Transl Med*, 10:216

**IF.: 3,459**

2. Changchien YC, Katalin U, Fillinger J, Fónyad L, **Papp G**, Salamon F, Sápi Z. (2012) A challenging case of metastatic intra-abdominal synovial sarcoma with unusual immunophenotype and its differential diagnosis. *Case Report Pathol*, 2012:786083

3. Changchien YC, Haltrich I, Micsik T, Kiss E, Fónyad L, **Papp G**, Sápi Z. (2012) Gonadoblastoma: Case report of two young patients with isochromosome 12p found in the dysgerminoma overgrowth component in one case. *Pathol Res Pract*, 208:628-632

**IF.: 1,213**

4. Balogh Z, Szemlaky Z, Szendrői M, Antal I, Pápai Z, Fónyad L, **Papp G**, Changchien YC, Sápi Z. (2011) Correlation between DNA ploidy, metaphase high-resolution comparative genomic hybridization results and clinical outcome of synovial sarcoma. *Diagn Pathol*, 6:107

**IF.: 1,638**

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik munkámhoz útmutatásaikkal és segítségükkel hozzájárultak.

Külön köszönöm témavezetőmnek Prof. Sápi Zoltánnak, hogy munkacsoportjába befogadott és tudományos tevékenységemet messzemenően támogatta.

Köszönettel tartozom Prof. Matolcsy Andrásnak, hogy az általa vezetett intézetben folytathattam PhD tanulmányaimat.

Köszönöm Dr. Bödör Csabának az értekezésem elkészítése során tett számos hasznos szakmai tanácsot és a sok baráti beszélgetést egyaránt.

Köszönöm Prof. Kovalszky Ilonának, hogy molekuláris biológiai kísérleteim döntő hányadát laboratóriumában végezhettem el.

Szeretném megköszönni a Lágyszövet- és csonttumor patológiai laboratórium volt tagjainak, Dr. Moskovszky Lindának és Dr. Yi-Che, William, Chang Chiennek az önzetlen szakmai segítséget és azt, hogy munkánk mindig kellemes, baráti légkörben zajlott. Polgár Zoltánné Ilának nagyon köszönöm a laboratóriumi szakasszisztensi segítséget és a számtalan élettapasztalatot, amit megosztott velem.

Köszönet jár a Molekuláris Diagnosztika laboratórium minden volt és jelenlegi munkatársának, név szerint: Dr. Baghy Kornéliának, Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Füle Tibornak, Fullár Alexandrának, Egedi Krisztinának és Dr. Oláh Lászlóné Júliának, akikhez segítségért bármikor fordulhattam, és akik egy baráti légkör megteremtésével is nagyban előnyömbre voltak munkám során. Csorba Gézánné Maricának köszönöm a sejttenyésztés kapcsán nyújtott segítségét. Tamási Annának és Szilágyiné Paulusz Mónikának köszönöm az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségüket. Köszönöm az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden tagjának, hogy munkámat derűs légkörben, segítségüket élvezve végezhettem.

Nem utolsó sorban szeretném hálámat kifejezni szüleimnek, családomnak, akik szerető gondoskodása, odaadása végigkísért eddigi pályám során. Végezetül őszinte hálámat és szeretetemet fejezem ki páromnak a szeretetért, soha nem apadó támogatásért, belém vetett hitért és bizalmáért.