

Gyermekkori kis kereksejtes daganatok (Ewing-sarcoma, pPNET) molekuláris genetikai vizsgálata

Doktori értekezés

Zentainé Dr. Patócs Barbara

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető : Dr. Fekete György egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Bartyik Katalin egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Kiss András egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tímár József egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Karcagi Veronika osztályvezető főorvos, Ph.D.

Dr. Pápai Zsuzsanna osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest

2015

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	2
2.	Rövidítések jegyzéke	4
3.	Bevezetés	7
3.1.	A tumorok Ewing-családja	8
3.2.	A Ewing-családba tartozó tumorok genetikája.....	8
3.2.1.	Az EWSR1-FLI1 transzlokációk.....	10
3.2.2.	Az EWS-fehérje felépítése	13
3.2.3.	A FLI1-fehérje felépítése.....	14
3.3.	Az EWS-FLI1 onkogén fehérje szerkezete és funkciója.....	15
3.3.1.	Az EWS-ETS fúziós fehérje targetgénjei.....	19
3.4.	Genetikai prognosztikai tényezők EFT-ben	27
3.4.1.	EWSR1-ETS transzlokáció típusok mint prognosztikai tényezők.....	27
3.4.2.	Szekunder kromoszóma- és/vagy génmódosulások	30
3.5.	Molekuláris diagnosztikai módszerek az EFT differenciáldiagnosztikájában	32
3.5.1.	FISH	33
3.5.2.	RT-PCR	35
3.5.3.	Molekuláris genetikai metodikatörténet az EFT diagnosztikájában	36
3.5.3.1.	Frissen fagyasztott minták vizsgálata	36
3.5.3.2.	Paraffinos minták vizsgálata.....	37
4.	Célkit zések	39
5.	Módszerek	40
5.1.	Betegcsoport	40
5.2.	RNS-izolálás.....	41
5.2.1.	RNS-izolálás frissen fagyasztott mintákból	41
5.2.2.	RNS-izolálás formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákból	41
5.3.	Primerek tervezése.....	42
5.4.	RT-PCR és multiplex PCR frissen fagyasztott mintákból származó RNS esetén.....	45
5.4.1.	Monoplex RT-PCR.....	45
5.4.2.	Nested multiplex PCR	45

5.5.	RT-PCR és PCR paraffinba ágyazott mintákból származó RNS esetén	46
5.5.1.	Multiplex RT-PCR	46
5.5.2.	Nested multiplex PCR	46
5.6.	Lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis	47
5.7.	Szekvenálás	49
5.8.	Kontroll.....	50
5.9.	A módszer optimalizálása.....	50
5.10.	Az EWSR1 gén transzkripció mintázatának vizsgálata.....	51
6.	Eredmények.....	52
6.1.	Frissen fagyasztott EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálata.....	52
6.2.	Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálata.....	60
7.	Megbeszélés.....	70
7.1.	Az EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálata	70
7.1.1.	Az EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálati eredményeinek megbeszélése.....	70
7.1.2.	Az EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálati módszerének megbeszélése.....	72
7.2.	Az egy mintában kimutatott többszörös fúziós transzkriptumok megbeszélése.....	78
7.2.1.	Irodalmi áttekintés	79
7.2.2.	Az EFT-mintákban azonosított többszörös EWSR-FLI1 transzkriptumok jellemzése.....	83
7.2.3.	Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációs típusok és a klinikai kép összefüggései.....	89
8.	Következtetések – a munka jelentése	93
9.	Összefoglalás	95
10.	Summary.....	96
11.	Irodalomjegyzék	97
12.	Saját publikációk jegyzéke	114
13.	Köszönetnyilvánítás	115

2. Rövidítések jegyzéke

AD – aktivációs domén

bp – bázispár

c-MYC – Cellular myelocytomatosis oncogene

CAV1 – Caveolin 1

CCDN1 – Cyclin D1

CCK – Cholecystokinin

CD99 – Cluster of differentiation 99

CITED2 – Cbp/p300-interacting transactivator 2

DAX – dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1

E1AF – E1A enhancer binding protein

EFT – tumorok Ewing-családja (Ewing family of tumors)

ERG – ETS-related gene

ES – Ewing-sarcoma (Ewing's sarcoma)

ETS – E26-transformation-specific

ETV – ETS variant

EWSR1 – Ewing sarcoma breakpoint region 1

EZH2 – Histone methyltransferase Enhancer of Zeste, Drosophila, Homolog 2

FEV – Fifth Ewing Variant

FFPE – formalinnal fixált, paraffinba ágyazott

FFT – frissen fagyasztott tumor

FLI1 – Friend Leukemia virus Integration site 1

FUS – Fused in Sarcoma

GC – Guanin-citozin

GLI1 – Glioma-associated oncogene homolog 1

HLH – kanyar-hurok-kanyar (helix-loop-helix)

hTERT – human Telomerase reverse transcriptase

ID2 – Inhibitor of differentiation 2

IGF1 – Insulin-like growth factor 1

IGFBP3 – Insulin-like growth factor binding protein 3

IQ – isoleucine-glutamine

kb – kilóbázis

MMP – Matrix metalloproteinase

NFATc2 – Nuclear Factor Of Activated T-Cells 2

NKX2.2 – NK2 transcription factor related, locus 2

NR0B1 – Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1

NTD-N – terminális domén

p21^{WAF1/CIP1} – Cyclin-dependent kinase-interacting protein 1

p57^{KIP2} – Cyclin-dependent kinase inhibitor of several G1 cyclin/Cdk complexes

PATZ1 – POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1

PBK – PDZ binding kinase

PDGF-C – Platelet-derived growth factor C

PLD2 – Phospholipase D2

PNET – primitív neuroectodermális tumor (primitív neuroectodermal tumor)

pPNET – perifériás primitív neuroectodermális tumor (periferial primitív neuroectodermal tumor)

RanBP2-like – Ran-binding protein 2-like

RG arginine-glicin

RNA BD RNS-köt domén

RNP – ribonukleoprotein

RRM – RNS-felismer motívum (RNA-recognition motif)

RT-PCR – Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Ser – szerin

SF1 Splicing factor 1

SP3 – Specificity Protein 3

SRCT – kis kereksejtes tumor

SMARCA5 – SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5

SYBR Green – a Synergy Brands Inc. bejegyzett védjegye

TAD – Transactivation domain

TET – Ten-eleven translocation

TGF -RII – Transforming growth factor type II receptor

TOPK –T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase

VEGF Vascular endothelial growth factor

UPP Uracil Phosphoribosyltransferase

ZSG Zinc finger Sarcoma Gene

ZF cinkujj szerkezet (Zink finger)

3. Bevezetés

A kis kereksejtes tumorok csoportja a hisztomorfológiai hasonlóságon alapuló besorolás révén rendkívül heterogén klinikumú malignus tumorokat foglal magába. Ide soroljuk a tumorok Ewing-családjába (EFT) tartozó Ewing-sarcomát és a primitív neuroectodermális tumort (PNET), továbbá a neuroblastomát, a non-Hodgkin lymphomát, a rosszul differenciált synovialis sarcomát, a rhabdomyosarcomát, a kissejtes osteosarcomát, a desmoplasticus kereksejtes tumort és a mesenchymalis chondrosarcomát. Munkám érdeklődési területe a tumorok e tág és differenciális diagnosztikai szempontból kihívásokkal teli körébe a Ewing-családba tartozó tumorokra irányult.

A Ewing-sarcoma a második leggyakoribb gyermek- és fiatal felnőttkori malignus csonttumor, mely az összes primer csonttumor kb. 10-15%-át teszi ki. Elfordulási gyakoriságát tekintve ugyanakkor nagyon ritka tumorfajta, éves elfordulási gyakorisága 1,28 új eset egymillió lakosra vonatkoztatva (Jawad és mtsai 2009), ami Magyarországon kb. 12 új beteget jelent évente. Elfordulása a 10-19 éves gyermek/fiatal felnőtt populációban ugrik meg első sorban, de minden életkorban elfordulhat. A Ewing-sarcomáról alkotott tudásunk gyarapítását nemcsak a tumor ritka volta lassítja, de a háttérben felismert többféle, Ewing-sarcomára/EFT-re specifikus transzlokáció is nehezíti a diagnózisalkotást és a szorosabb genotípus-fenotípus összefüggések felismerését, továbbá a kiindulási pontnak számító prekursor sejtek ismeretlen jellege, valamint a transzlokációról átíródó, onkogén transzkripciósfaktorként működő fúziós fehérje bonyolult és szerteágazó hatásmechanizmusa is homályosítja a Ewing-sarcomáról szerzett molekuláris ismereteinket.

Mintegy 90 év telt el James Ewing 1921-ben megfogalmazott felismerése óta, melyben „diffuse endothelioma of bone” név megalkotásával kísérletet tesz a Ewing-sarcoma osteosarcomától való megkülönböztetésére, valamint majd 30 év telt el az EFT háttérben álló kromoszóma-átrendezés azonosítása óta. Az utóbbi évtizedekben folyamatosan gyorsuló molekuláris biológiai és molekuláris patológiai technikai fejlődés ellenére még messze vagyunk a Ewing-sarcoma tumorigenezisének és patomechanizmusának teljes megértésétől, de egyre több részletére vagyunk rálátással.

Ebben a felgyűlt, de sok helyen még rendszerezetlen tudásanyagban igyekszem jelen munkámmal felvázolni kutatásom elméleti hátterét, egy új, kis mintaigényű metodika bemutatásával gazdagítani a rendelkezésre álló molekuláris diagnosztika kelléktárát, valamint pontosítani a Ewing-családba tartozó tumorok patogenezisében gyakran szerepet játszó, de a kutatói érdeklődés szempontjából eddig méltánytalanul háttérbe szorult jelenségre, az EFT-re specifikus transzlokációkról átíródó transzkriptumokat érintő alternatív splicingról rendelkezésre álló ismereteinket.

3.1. A tumorok Ewing-családja

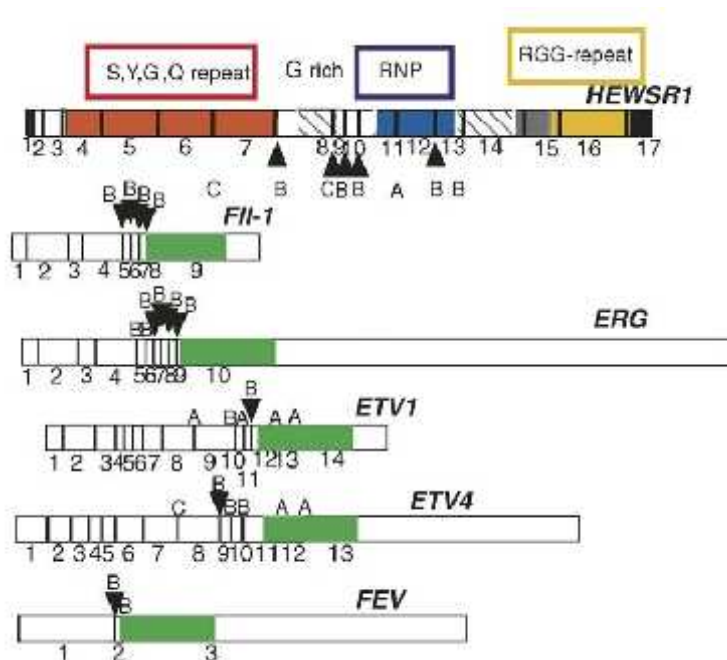
A Ewing family of tumors (EFT) kifejezést Delattre az elsők között használja 1994-ben (Delattre és mtsai 1994), a kis kereksejtes tumorok egy alcsoportjára vonatkoztatva, kifejezve, hogy tagjai közt nemcsak szövetmorfológiai hasonlóság áll fent, de a malignitás háttérben álló kromoszóma-rendellenesség is azonos. A tumorok Ewing-családja elsősorban molekuláris patológiai kifejezés, mely olyan betegségeket foglal magába, mint a csontok Ewing-sarcomája (ES), az extraossealis Ewing-sarcoma és a perifériás primitív neuroectodermális tumor (pPNET). A Ewing-sarcoma és a pPNET az azonos klinikai, immun-hisztokémiai és molekuláris genetikai jellemzők alapján ugyanazon tumor két morfológiai variánsának tekinthetők.

3.2. A Ewing-családba tartozó tumorok genetikája

A tumorok Ewing-családjának legfontosabb genetikai jellemzője a 21. kromoszóma hosszú karján (22q12) elhelyezkedő, a fehérjék TET-családjának egyik tagját kódoló EWSR1 gén (Ewing sarcoma breakpoint region 1), és az ETS-családba (E26-transformation-specific) sorolható öt transzkripciós faktor egyik tagját kódoló gén között létrejövő reciprok kromoszómális transzlokáció. Az EWSR1 gén transzlokációs partnere leggyakrabban az FLI1 gén (11q24) (85-95%) vagy az ERG gén (21q22) (5-10%) (Sorensen és mtsai 1994). Ritkább esetben azonban az ETV1 (7p22) (~1%) (Jeon és mtsai 1995), ETV4/E1AF (17q12) (~1%) (Urano és mtsai 1996), illetve a FEV gén

(2q33) (1%) (Peter és mtsai 1997) is részt vehet az EWSR1 gén partnergéneként az EFT-specifikus transzlokációkban.

Az EFT, valamint a Ewing-sarcomához hasonló tumorok (Ewing's sarcoma like tumors) háttérben álló transzlokációk sokszín sége az utóbbi években tovább gazdagodott azon felismerés által, miszerint mindkét transzlokációs partner felcserélhet más génekkel. Az újonnan, szórványosan azonosított, nem a transzkripció faktorok ETS-családjába tartozó C-terminális partnerek mellett, mint a PATZ1/ZSG (Mastrangelo és mtsai 2000), SP3 (Wang és mtsai 2007), NFATc2 (Szuhai és mtsai 2009) és SMARCA5 (Sumegi és mtsai 2011) gének, a transzlokációban részt vehet a TET-családba tartozó génnek másik tagja, a FUS gén (16p11) (Shing és mtsai 2003, Ng és mtsai 2007) is.



1. ábra Az EWSR1 és az EFT-specifikus transzlokációban résztvevő partnereinek sematikus rajza a géneken elhelyezkedő lehetséges töréspontok feltüntetésével (Aman és mtsai 2005, A szerzőktől átvett ábrán feltüntetett Fli-1 rövidítés az disszetrációban alkalmazott FLI1-nek felel meg)

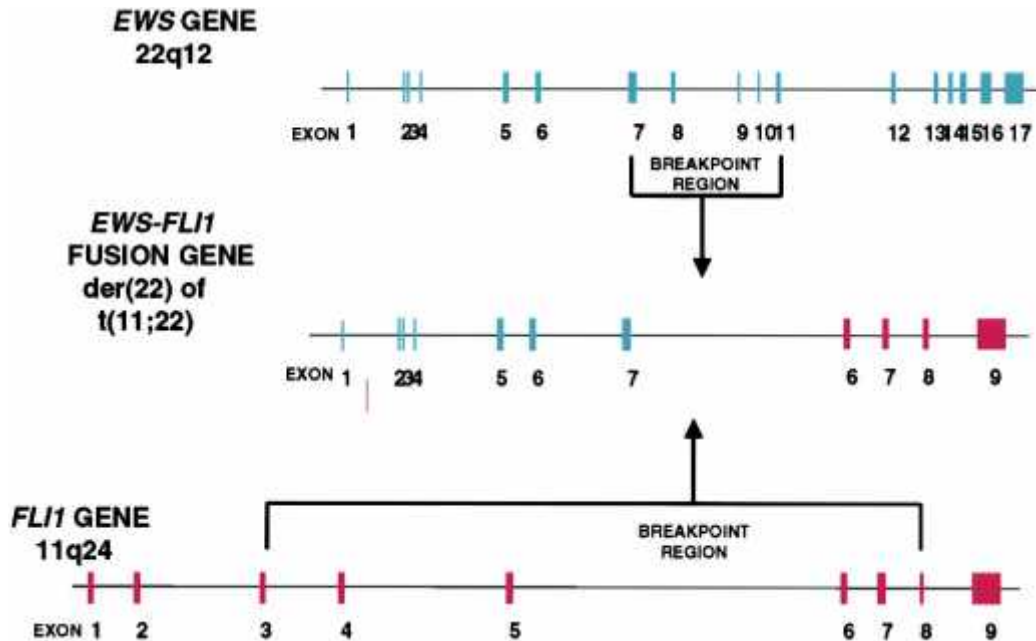
Az EWSR1-ETS transzlokációk legrégebben ismert és leggyakoribb képviselője az EWSR1-FLI1 transzlokáció, mely tökéletes modellje az EFT-specifikus transzlokációk heterogén előfordulásának.

Az egyes EFT-specifikus transzlokációk alternatív partnereiből adódó heterogenitása mellett a molekuláris genetikai alapokon nyugvó diagnosztikát tovább nehezíti, hogy egyes transzlokációk esetében a partnereken található töréspont elhelyezkedése is változó lehet (1. ábra).

3.2.1. Az EWSR1-FLI1 transzlokációk

A Ewing-családba tartozó tumorokra jellemző leggyakoribb t(11;22)(q24;q12) transzlokáció, melyet 1983-ban egymástól függetlenül írt le két francia munkacsoport (Aurias és mtsai 1983, Turc-Carel és mtsai 1983), az első molekulárisan jellemzett, tumorspecifikus, nem hemopoetikus kromoszóma-átrendeződések közé tartozik. Az EFT eseteinek 85-95%-ára jellemző reciprok transzlokációban az EWSR1 gén, valamint a 11. kromoszóma hosszú karján található FLI1 gén (Friend Leukemia virus Integration site 1) vesz részt.

Az EWSR1 gén kb. 32,5 kb hosszú, 17 exonból áll, leggyakoribb transzlokációs partnere, az FLI1 pedig kb 128 kb hosszú, 9 exont tartalmazó gén. A töréspontok elhelyezkedéséről a géneken belül (2. ábra) két, viszonylag nagyszámú, 89 Ewing-sacoma (Zucman és mtsai 1993), valamint 77, igazoltan EWSR1-FLI1 transzlokációt hordozó ES/pPNET tumorminta (Zucman és mtsai 1998) szekvencia analízisének keresztül van információnk. Az EWSR1 génen a töréspontok két, egyenként 3 valamint 1,2 kb-ból álló régióban helyezkednek el, melyeket a 8. intronban található 1,2 kb-nyi, töréspont-mentes szakasz választ el egymástól. Ez a két töréspont-régió voltaképpen átöleli az 1. ábrán is feltüntetett, 7. intron elejétől a 10. exon végéig tartó génszakaszt. Az FLI1 génen belül Zucman és munkatársai eredményei alapján a lehetséges töréspontok kb. 40 kb hosszú, a 3. introntól a 7. intronig tartó génszakaszon belül oszlanak el (Zucman és mtsai 1992, Plougastel és mtsai 1993, Zucman és mtsai 1993). Egy későbbi tanulmány ugyanakkor az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 9) transzkriptum azonosításáról is beszámol, amely felveti töréspont lehetőségét az FLI1 gén 8. intronjában is (Zoubek és mtsai 1994).



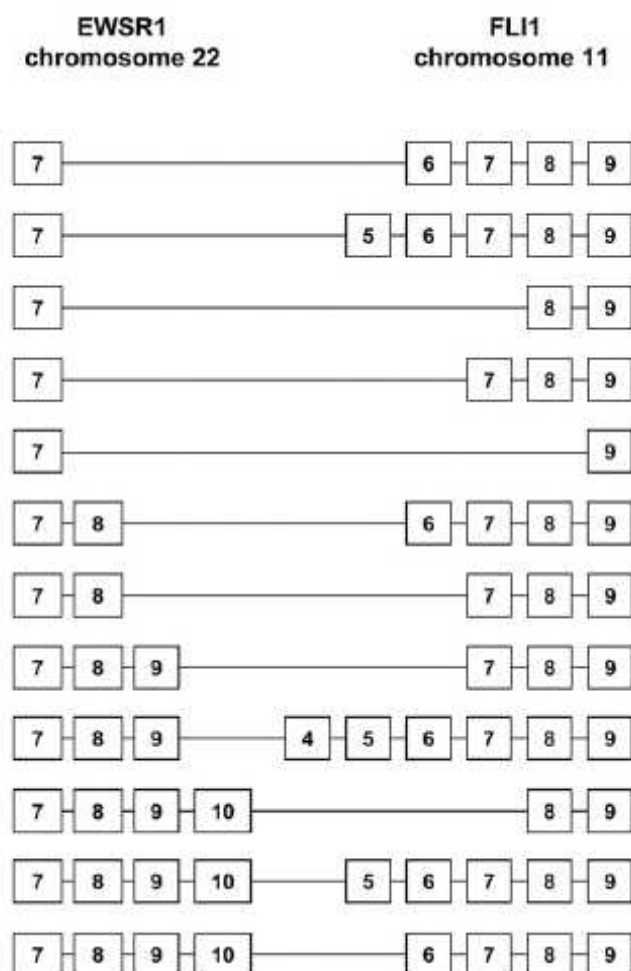
2. ábra Az EWSR1 gén és az FLI1 gén transzlokációjának, valamint a lehetséges töréspontok régióinak vázlatos ábrája (Sandberg és Bridge 2000)

A töréspontok túlnyomó többségben intronikus elhelyezkedések, és el fordulási gyakoriságuk egyenesen arányos az intronok hosszával (Lin és mtsai 1999), ennek megfelelően a töréspont-régiók legnagyobb intronjaiban fordul el legnagyobb számban töréspont. Az EWSR1 génen a 1,4 kb-nyi 7. és 2,7 kb-nyi terjedelmű 8. intronban 69 esetben 134 (49%) és 27 (39%) esetben azonosítottak töréspontot. Az FLI1 génen a 23,3 kb hosszú 5. és a 8,9 kb hosszú 4. intronban 63 esetben 137 (59%) és 19 (30%) esetben volt megtalálható a töréspont (Zucman és mtsai 1993).

A két leggyakoribb, az összes EWSR1-FLI1 transzlokációt hordozó tumoros esetek kb. 3/4-ében jelenlévő kiméra transzkriptum az 1. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) (az EWSR1-FLI1 hordozó esetek 50-60%-ában) és a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) (25%). Ugyan a 8. intron a leghosszabb az EWSR1 génen található töréspont-régió belül, az EWSR1 8. intronját érintő transzlokációk ritkán íródnak át módosulás nélkül, mivel az így átíródó kiméra transzkriptum az olvasási keret eltolódásával, azaz „out of frame” transzkriptum létrejöttével idővel a stopkodon megjelenéséhez és csonka fúziós fehérje szintéziséhez vezet. Ezekben az esetekben az alternatív splicing mechanizmus révén a 8. exon általában kivágódik, és a 7. exonhoz kapcsolódik a töréspontnak megfelelő FLI1 exon. A splicing révén az olvasási keret érintetlen marad, és „in frame”

transzkriptum, valamint biológiailag aktív kiméra fehérje szintetizálódik (Zucman és mtsai 1993).

A leírt töréspont-régiókkal összhangban az EWSR1 génen belül 4 intronban (a 7, 8, 9. és 10. intronban), az FLI1 génszekvenciáját tekintve pedig 6 intronban (a 3, 4, 5, 6, 7. és 8. intronban) fordulhat el kisebb-nagyobb gyakorisággal töréspont. Amennyiben a töréspontok megjelenése független a másik génen kialakuló töréspont helyzetét l, és eddig ennek ellentmondó adat még nem merült fel, úgy elvileg 24-féle kombináció kialakulása lehetséges az EWSR1 és FLI1 gének transzlokációja során. Ezen lehetséges transzlokáció-típusokon belül 18-féle „in-frame” kiméra transzkriptum megjelenésére lehet számítani mRNS-szinten, az olvasási keret eltolódása miatt pedig 6 out-of-frame transzkriptum lehetséges, melyekben az EWSR1 8. exonja egy FLI1 exonnal egyesül. A



3. ábra Az EWSR1-FLI1 transzlokáció leggyakoribb, töréspont-függő típusai (Gambieri és mtsai 2011)

24 lehetséges transzlokáció-típusból egy tanulmány (Gambieri és mtsai 2011) az eddigi irodalom rendszerezésével 12 eddig publikált „leggyakoribb” transzlokáció-típust sorol fel (3. ábra), mely vélhetően az összes eddig közzé tett EWSR1-FLI1 transzlokáció vagy a transzkriptum szekvenciájából visszakövetkeztetett transzlokáció típusának listája. Természetesen nagy valószínűséggel vannak olyan EWSR1-FLI1 transzlokáció típusok is, melyeket a tudományos érdeklődés változása miatt már nem találhattak közzé tették, ezért nem szerepelnek a listában. Kutatásom során éppen ezért mind a 24 lehetséges transzlokációs típus

lehetséges el fordulásával számoltam, és ezek figyelembe vételével terveztem a szükséges primereket.

3.2.2. Az EWS-fehérje felépítése

Az EWSR1 génr 1 átíródó EWS-fehérje a RNS-kötő fehérjék ribonukleoprotein családján belül az ún. TET-család tagja, mely család génjei a sarcomákra specifikus kromoszóma-transzlokációk mintegy 50%-ában vesznek részt, és közös jellemzőjük a 87 aminosavból álló, a fehérje C-terminálisán elhelyezkedő RNS-kötő RRM-domén (RNA-recognition domain) (4. ábra). Az EWS-fehérje C-terminálisán az RRM-domént körülvevő három, argininben és glicinben gazdag, RNS-kötést elősegítő ún. RG domén, valamint a C-terminális legvégén egy RanBP2 típusú cinkujj szerkezet található. A fehérje N-terminálisán helyezkedik el a transzaktivációs domén (TAD), melynek szekvenciája 40%-ban azonos az eukarióta RNS polimeráz II bázissorrendjével (Delattre és mtsai 1992), továbbá az SF1 splicing faktorkötő hely (Zhang és mtsai 1998) és az IQ domén.



4. ábra Az EWS-fehérje szerkezete. TAD-transzaktivációs domén, SF1int – SF1-gyel interakcióba lépő szerkezet, IQ - IQ domén, RG - arginin/glicin gazdag domén, RRM – RNS felismerő domén, ZF – cinkujj szerkezet (Huret 2010)

Az N-terminális TAD domén degenerált, szerinben, tirozinban, glicinben és glutaminban gazdag ismétlődő szekvenciákat tartalmaz és a többi TET-családtag transzaktivációs doménjéhez hasonlóan más transzkripciós faktorokkal és regulátorokkal, mint pl. a TFIID és az RNS polimeráz II, komplexet alkotva transzkripciós aktivátor szerepet tölt be (May és mtsai 1993b, Bertolotti és mtsai 1998). Az EWS-fehérje N-terminálisával a hiperfoszforilált RNS polimeráz II-hez, C-terminálisával pedig az SR splicing faktorokhoz képes egyszerre kapcsolódni, részt vállalva így nemcsak a transzkripcióból, de a mRNS-érés folyamatából is (Yang és

mtsai 2000). Az EWS-fehérje N-terminálisa képes kötődni az U1C splicing faktorhoz is, mely a pre-mRNS érését indító korai spliceosome komplex E összeállítását végzi (Knoop és Baker 2000).

A 7. és 8. exon határán átívelő IQ-domén egy konzervált kalmodulinkötő hely, mely egy belső proteinkináz C foszforilációs helyet (Ser266) rejt. A szerin foszforilációja konformáció változást okoz, mely serkenti a promoterkötést, a fehérje-fehérje interakciókat, valamint csökkenti az EWS-fehérje RNS-kötő képességét, ezáltal szabályozva a fehérje működését (Olsen és mtsai 2001). Ugyanakkor az N-terminálison lévő RG domének is képesek a TAD domén működésének gátlására, valamint más aktivációs domének gátláson keresztüli szabályozására (Rossow és mtsai 2000, Alex és mtsai 2005).

Az EWS-fehérje pontos funkciója még nem ismert, de valószínűleg a transzkripció szabályozásában (May és mtsai 1993b, Bertolotti és mtsai 1998), a pre-mRNS splicingban (Zhang és mtsai 1998, Yang és mtsai 2000), a meiózisban, a sejttöregedésben (Li és mtsai 2007) és a sejtciklus szabályozásában (Leeman-Zakaryan 2009) vesz részt.

3.2.3. A FLI1-fehérje felépítése

A 11. kromoszómán elhelyezkedő FLI1 gén a transzkripciós faktorok ETS-családjába tartozik, mely család jellegzetessége a 3' végen található 87 aminosav hosszúságú DNS-kötő ETS domén jelenléte. Ez az ETS-domén specifikusan kötődik a purinban gazdag, centrális GGAA/T-magot hordozó DNS-szekvenciákhoz (Oikawa és Yamada 2003). Az FLI1 génről írták le az FLI1-fehérje N-terminálisán egy transzkripció aktivációs domén (AD) és egy spirál-hurok-spirál (HLH-helix-loop-helix) szerkezetű, fehérje-fehérje interakciókban résztvevő PNT domént (Pointed), C-terminálisán pedig a DNS-kötő ETS domén, valamint a C-terminális aktivációs domén található (5. ábra). Az N-terminális AD erőteljesebb aktivátorként működik, mint a C-terminális AD, mivel az N-AD hiányában a C-AD aktivitása jelentősen csökken, míg fordított helyzetben, a C-terminális AD hiánya esetén az N-terminális aktivációs domén transzkripciós aktivitása nagymértékben fokozódik (Rao és Yamada 1993).



5. ábra Az FLI1 fehérje vázlatos szerkezete. AD – aktivációs domén, HLH – kanyar-hurok-kanyar (helix-loop-helix) (Oikawa és mtsai 2003)

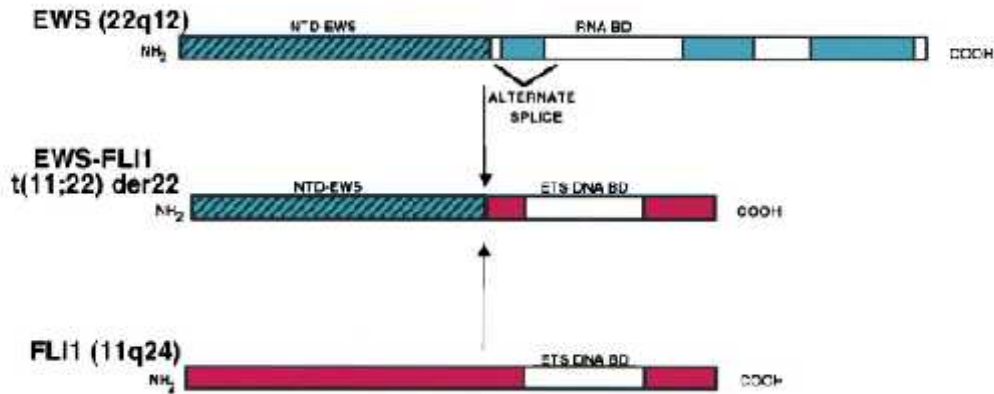
Az FLI1-fehérje izolálására els ként a Friend murine leukemia vírus indukálta erythroleukémiás sejtekben került sor. Feln tt szövetekben els sorban hemopoetikus sejtvonalakban expresszálódik nagyobb mennyiségben ez a fehérje, de kisebb mennyiségben kimutatható más, pl. a tüd -, szív- és az ovarium-szövetekben is (Ben-David és mtsai 1991). Az embrionális fejlődés során f ként a hematopoetikus és endoteliális sejtekben fejeződik ki, és e sejtvonalak differenciálódásában vesz részt (Oikawa és Yamada 2003).

Adatok utalnak a natív FLI1-fehérje részvételére sejtek transzformációjában és az onkogenezisben is. Tamir és munkatársai (Tamir és mtsai 1999) tanulmányukban kimutatták, hogy a retinoblastoma (Rb) gén rendelkezik rejtett ETS-kötő hellyel a promoterén. Az FLI1-fehérje, kapcsolódva ehhez az ETS-kötő helyhez, képes transzkripcionális szinten gátolni a retinoblastoma gén expresszióját, és így el segíteni a G1-S átmenetet a sejtciklusban. Erythroblastokban pedig az FLI1 módosító szerepére derült fény a terminális differenciálódás és proliferáció egyensúlyában: a fokozott FLI1-expresszió gátolta az apoptózist és a végső differenciálódást, valamint eritropoetin jelenlétében serkentette a differenciálatlan erythroblastok proliferációját (Pereira és mtsai 1999).

3.3. Az EWS-FLI1 onkogén fehérje szerkezete és funkciója

Az EWSR1 és az FLI1 géneken található töréspontok elhelyezkedésének vizsgálata nyilvánvalóvá tette, hogy az EWSR1-FLI1 transzlokáció során, a töréspontok eltérő elhelyezkedéséből fakadóan különböző hosszúságú fúziós gének jöhetnek létre, és ezek mindegyike kötelező jelleggel tartalmazza az EWSR1 gén első hét, valamint a FLI1 gén utolsó, 9. exonját (Delattre és mtsai 1992, Plougastel és mtsai 1993, Zucman és mtsai 1993). Az EWSR1-FLI1 transzlokációról átíródó kiméra fehérjében ennek

megfelel en az EWS-fehérje N-terminális TAD doménje kapcsolódik össze az FLI1-fehérje DNS-kötő képességgel bíró ETS, valamint a C-terminális aktivációs doménjével (6. ábra).



6. ábra Az EWS-FLI1 fehérje vázlatos szerkezete. NTD-N-terminális domén; RNA BD-RNS-kötő domén (Sandberg és Bridge 2000)

A fúziós fehérjében szereplő domének fontosságát, transzformációban betöltött szerepét több kiemelkedő tanulmány is vizsgálta. May és munkatársai egyik tanulmányukban (May és mtsai 1993a) az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6), valamint EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) transzlokációs szekvenciákat juttatták be retrovírus vektor segítségével NIH 3T3 sejttenyészetekbe. Egymástól függetlenül mindkét kiméra gén képes volt a sejtek transzformációjára. Ezt követően, szintén vírusvektorok révén olyan módosított EWSR1-FLI1 szekvenciákkal fertőzték meg a sejttenyészeteket, melyekben hiányzott az EWS-eredetű, N-terminális TAD, ill. a FLI1-eredetű, C-terminális DNS-kötő domén szekvenciája. A módosított EWSR1-FLI1 gének egyike sem volt képes transzformálni a sejteket, bizonyítva ezzel mindkét domén jelentőségét a prekursor sejtek transzformációban. A May-munkacsoport másik fontos közleményében (May és mtsai 1993b) az EWS-FLI1 kiméra N-terminális aktivációs doménjének aktivátor hatását hasonlították össze a natív FLI1 N-terminális aktivációs doménjével egy riportergénkonstrukció segítségével. Kísérletükben az EWS-FLI1 N-terminális doménje mintegy 30-szorosan erősebb transzkripciós aktivátornak bizonyult az FLI1 N-terminális aktivációs doménjéhez képest. Ugyanebben a tanulmányban bizonyították azt is, hogy míg az EWSR1-FLI1 vírusvektor transzformálni tudta a NIH 3T3 sejteket, az

FLI1 tartalmú vektor nem volt képes kiváltani transzformációt, azaz a két génkonstrukció hatása között nemcsak mennyiségi, de egyértelmű különbség is van. A jelenségre három lehetséges magyarázat született: (1) az EWS-FLI1 és az FLI1 targetgénjeinek köre azonos, de a kiméra erőteljesebb és/vagy stabilabb DNS-kötésre képes a C-terminális doménjén a megváltozott N-terminális domén feltételezett modulátor hatása révén; (2) a targetgének köre, valamint a DNS-kötés erőssége is azonos, és az EWS-FLI1 erőteljesebb transzkripciós faktor hatásának tulajdonítható a transzformáló hatás; (3) a két transzkripciós faktor targetgénjeinek köre nem fedi egymást.

Ugyanezen kutatócsoporttól látott napvilágot egy harmadik tanulmány is (Lessnick és mtsai 1995), mely az EWS-FLI1 fehérje N-terminális aktivációs doménjét vizsgálva jutott arra a megállapításra, miszerint az AD két részből áll: az N-terminális A doménből, melynek erőteljesebb transzformációs, de gyengébb transzkripciós aktivátor hatása van, valamint a disztálisabban elhelyezkedő B doménből, melynek erősebb a transzaktivációs hatása, mint a transzformációs. Ez a publikáció már felveti, hogy az EWSR1-FLI1 onkogenetikus hatása nemcsak DNS-dependens módon, de DNS-kötéstől független, fehérje-fehérje kapcsolatokon alapuló transzkripció-szabályozó hatásmechanizmus révén is érvényesülhet.

May és munkatársai közlései óta több kutatócsoport is megérősítette az EWS-FLI1 fúziós fehérje transzformációs képességét. Szekvencia-specifikus antiszensz oligonukleotidok (Ouchida és mtsai 1995, Kovar és mtsai 1997, Toretsky és mtsai 1997, Tanaka és mtsai 1997) vagy RNS interferencia (Priour és mtsai 2004, Chansky és mtsai 2004, Kinsey és mtsai 2006, Smith és mtsai 2006) révén gátolt EWS-FLI1 expressziójú sejtek vizsgálatakor a tumorsejtek növekedésének gátlását, vitalitásuknak a csökkenését, a transzformáció gátlását, valamint fokozott apoptózis hajlamot észleltek. Más kutatócsoportok az EWS-FLI1 kiméra fehérje C-terminális DNS-kötő helyének pontmutációk vagy deléciók általi módosításával kísérleteztek, és eredményeik alátámasztják a transzformáló hatás különböző mértékű csökkenését. Ugyanakkor a transzformáció bizonyos fokú fennmaradása felveti a DNS-től független onkogén jelű létezését a kiméra fehérje DNS-dependens onkogén hatásmechanizmusa mellett (Jaishankar és mtsai 1999, Welford és mtsai 2001).

A legkorábbi tanulmányok May és munkatársaihoz (May és mtsai 1993b) hasonlóan az EWS-FLI1 onkogén fehérjének, ill. ezen belül is els sorban a C-terminális DNS-köt doménnek fként transzkripciós aktivátor funkciót tulajdonítottak (Ohno és mtsai 1993, Bailly és mtsai 1994, Lessnick és mtsai 1995, Rossow és mtsai 2001). Rao és munkatársai (Rao és mtsai 1993) ugyan már 1993-ban felvetették, hogy az FLI1 C-terminális doménjének egyszerre lehet represszor és aktivátor hatása a megfelelő targetgének függvényében, a kimérafehérje gátló jelleg szabályozó funkciója els sorban a targetgén kutatása kapcsán került ismét az érdeklés középpontjába (Hahm és mtsai 1999, Arvand és mtsai 2001, Nakatani és mtsai 2003, Prieur és mtsai 2004, Smith és mtsai 2004, Hancock és mtsai 2008, Kauer és mtsai 2009). Pár munkacsoport (Arvand és mtsai 2001, Smith és mtsai 2004) arra az eredményre jutott, hogy az EWS-FLI1 fehérje transzkripció gátló hatása jóval jelentesebb az aktivátor hatásánál, de a későbbi tanulmányok az aktivált és gátolt targetgének arányát kiegyenlítettnek találták.

Egyes szerzők (Arvand és mtsai 2001, Smith és mtsai 2004) felvetik a transzkripciós aktivátor és represszor jelű elválását is, melynek magyarázatára az alábbi feltételezések születtek: (1) a transzkripciós gátlás egy eddig ismeretlen doménen keresztül jönne létre; (2) az EWS-FLI1 fehérje bizonyos targetgének promoterein enyhébb fokú aktivátor hatást fejt ki mint más ETS-fehérjék, és ezekkel versenyezve a targetgének promoterein, gátolja az ETS-fehérjék teljes aktivátor hatását; (3) az EWS-FLI1 transzkripciót gátló faktorok termelését serkenti, és így indirekt transzkripciós represszor hatást fejt ki.

Az EWS-FLI1 kiméra azonban nem csak onkogén transzkripciós faktorként fejt ki transzformációs hatását, a transzkripción túl a poszttranszkripciós módosulás folyamatára is hatással lehet. A targetgének transzkripciós szabályozásán, serkentésén vagy gátlásán túl a fúziós fehérje aberráns splicing faktorként is viselkedik, megszakítva az RNS splicing megszokott, U1C és YB-1 által közvetített folyamatát. Knoop és Baker kimutatta (Knoop és Baker 2000, Knoop és Baker 2001), hogy az EWS-fehérjéhez hasonlóan az EWS-FLI1 is kapcsolatban áll az egyik U1 ribonukleoprotein-specifikus fehérjével, az U1C-vel, továbbá az EWS-FLI1 megváltoztatja a hnRNPA1 által indított alternatív 5'-splice hely választás folyamatát, és ezáltal módosíthatja az aktív spliceosome összetételét. Az EWS-FLI1 ezen kívül az N-terminális EWS-doménjén

keresztül er sebben kapcsolódik az YB-1-hez mint a natív EWS-fehérje, és az YB-1-EWS-RNS polimeráz II komplex megghiúsításán keresztül képes gátolni az E1A pre-mRNS posztranszkripció éréseinek, splicingjének folyamatát (Chansky és mtsai 2001).

3.3.1. Az EWS-ETS fúziós fehérje targetgénjei

Az EWS-ETS fehérje, mint onkogén transzkripció faktor, nagyszámú, különböző sejt folyamatokban résztvev gén transzkripcióját aktiválja, vagy éppen gátolja. Az utóbbi évtizedben elterjedt új metodikák, mint például a microarray és a kromatin immunprecipitációs (ChIP) vizsgálatok, nagymértékben felgyorsították az EWS-ETS interakciók vizsgálatát, folyamatosan b vítve a kiméra fehérje közvetlen és közvetett targetgén jelöltjeinek számát.

Az EFT targetgén kutatása a kiindulási szövettípus ismeretének hiányában kétféle megközelítésben zajlik, és ennek megfelelő en az eredmények összehasonlítása sok esetben ellentmondásos. Egyik esetben a vizsgálat alapját az EWSR1-ETS kiméra gén EFT-sejtvonalakban történ kiütése szolgáltatja (Smith és mtsai 2006, Siligan és mtsai 2005, Kauer és mtsai 2009, Prieur és mtsai 2004, Kinsey és mtsai 2006, Gangwal és mtsai 2008). A másik esetben pedig más sejttényészeteket transzformálnak exogén EWSR1-EFT kiméragénnel (Deneen és mtsai 2003b, Lessnick és mtsai 2002, Rorie és mtsai 2004, Riggi és mtsai 2005, Hu-Lieskovan és mtsai 2005, Braunreiter és mtsai 2006). Az egyik legösszetettebb targetgén-vizsgálat során Smith és munkatársai (Smith és mtsai 2006) összehasonlították az EWSR1-ETS kiméra gén kiütésével módosított EFT-sejtvonal microarray vizsgálati eredményét, valamint ugyanezen kiütött EFT-sejtvonal microarray analízisét is exogén EWSR1-EFT kiméragénnel való újra transzformálása után, eredményeik azonban csak részben er sítették meg az eddig elfogadott targetgének transzkripcióváltozását.

Az EFT transzkripció profiljának metaanalízisét Hancock és munkatársai végezték el (Hancock és mtsai 2008). Az utóbbi évek nagyobb targetgén kutatásainak eredményeit összehasonlítva azt találták, hogy a serkentett gének köre nagyobb mértékben egyezik az egyes tanulmányok eredményeiben, mint a gátolt gének csoportja. Ez alapján azt valószínű sítik, hogy a gátolt gének els sorban indirekt targetgének, vagy pedig az egyes sejttényészetekre jellemző szabályozó folyamatoktól függenek. Az összehasonlítás másik következtetése szerint a patkány sejttényészet alapú

modellrendszerek (Deneen és mtsai 2003b, Riggi és mtsai 2005, Braunreiter és mtsai 2006) nem mutatnak korrelációt a humán sejttenyészetben alapuló, vagy EFT alapú modellrendszerekkel. Ezen túl azonban a Rorie-féle modell kivételével (Rorie és mtsai 2004) mind az EWSR1-ETS kiütését (Lessnick és mtsai 2002, Hu-Lieskovan és mtsai 2005), mind pedig az exogén EWSR1-EST transzformációját alapul vevő modellrendszerek (Smith és mtsai 2006, Siligan és mtsai 2005, Prieur és mtsai 2004, Kinsey és mtsai 2006) révén kimutatott lehetséges targetgének köre szignifikáns összefüggést mutatott.

Az EWSR1-ETS fúziógénnek a sejtek transzkripciójára gyakorolt pontos hatása ugyan gyarapodó ismereteink ellenére is sok tekintetben homályos, vannak azonban gének, melyek expressziója igazoltan egyenesen vagy fordítottan arányos az EWSR1-ETS kiméra gén kifejezésével. A legfontosabb targetgének listáját az 1. táblázat tartalmazza, elsősorban a rosszindulatú tumorkok Hanahan és Weinberg által leírt biológiai sajátosságainak megfelelően csoportosítva (Hanahan és Weinberg 2011). Ezen targetgének jórészt már bebizonyosodott, hogy promoterüket az EFT-sejtekben a kiméra fehérje szabályozza, továbbá az EWS-ETS fehérje kötődik is a promoter régiójukhoz, így ezek a gének direkt targetgének tekinthetők. Egyes gének esetében azonban az EWS-ETS fehérje és a gén promotere közötti közvetlen kapcsolat nem bizonyított, így ezek a gének nagy valószínűséggel az EWS-ETS fúziós fehérje közvetett szabályozása alatt állnak.

1. Táblázat Az EWS-EFT fehérje közvetlen és közvetett targetgénjeinek listája. A vastagon szedett név gének közvetlen, a többi gén feltehetően közvetett targetgénje az EWS-ETS fehérjének.

Gén neve	Serkentés (+)/gátlás (-)	A targetgén szerepe	Hivatkozás
1. PROLIFERÁCIÓS SZIGNÁL FENNTARTÁSA – KRÓNIKUS PROLIFERÁCIÓ			
p21^{WAF1/CIPI}	-	- G1-S átmenet gátlása	Nakatani és mtsai 2003
p57 ^{KIP2}	-	- sejtproliferáció (S fázisba való belépés) gátlása	Dauphinot és mtsai 2001
ID2	+	- onkogén - Rb-család inaktivációja - sejtciklusba való belépés - sejtnövekedés serkentése - sejt differenciálódás gátlása	Nishimori és mtsai 2002 Baer és mtsai 2004 Hu-Lieskovan és mtsai 2005 Riggi és mtsai 2008 Fukuma és mtsai 2003
CCDN1	+	- onkogén - Wnt-jelút része - foszforilálja és inaktiválja a Rb-fehérjét	Dauphinot és mtsai 2001 Fukuma és mtsai 2003 Baer és mtsai 2004 Hu-Lieskovan és mtsai 2005
NKX2.2	+	- transzkripciós faktor - sejtproliferáció - neuronális differenciálódás	Miyagawa és mtsai 2008 Riggi és mtsai 2008 Cheung és mtsai 2007 Owen és mtsai 2008
TOPK/PBK	+	- sejtproliferáció és -motilitás - neuronális marker	Herrero-Martín és mtsai 2009
GLI1	+	- Hedgehog-útban résztvevő transzkripciós faktor	Beauchamp és mtsai 2008

EZH2	+	<ul style="list-style-type: none"> – hiszton metiltranszferáz – géncsendesítésben játszik szerepet – E2F-függő proliferációs jelút része – neuroectodermális és endothel differenciálódásban szerepet játszó géneket szabályoz 	<p>Riggi és mtsai 2008</p> <p>Burdach és mtsai 2009</p> <p>Richter és mtsai 2009</p>
PLD2	+	<ul style="list-style-type: none"> – sejtnövekedés – a PDGF-BB-közvetített ERK1/2, Akt, és mTOR jelút része 	<p>Nozawa és mtsai 2005</p>
CD99	+	<ul style="list-style-type: none"> – sejtmembrán glikoprotein – a neuronális differenciálódás inhibitora – a MAPK jelút szabályozása az ERK1/2 gátlásán keresztül 	<p>Rocchi és mtsai 2010</p>
CCK	+	<ul style="list-style-type: none"> – autokrin növekedési faktorként működik – sejtproliferáció – neuronális marker 	<p>Hu-Lieskovan és mtsai 2005</p> <p>Carrillo és mtsai 2007</p> <p>Reubi és mtsai 2004</p>
c-MYC	+	<ul style="list-style-type: none"> – onkogén transzkripciós faktor – sejtciklusba lépés serkentése – S-fázishoz kapcsolt gének transzkripciója 	<p>Hu-Lieskovan és mtsai 2005</p> <p>Dauphinot és mtsai 2001</p> <p>Fukuma és mtsai 2003</p>
2. TUMORSZUPPRESSZOROK GÁTLÁSA			
p21^{WAF1/CIPI}	-	<ul style="list-style-type: none"> – G1-S átmenet gátlása 	<p>Nakatani és mtsai 2003</p>
TGF-β-RII	-	<ul style="list-style-type: none"> – TGF-β jelút tumor szuppresszor hatásának biztosítása 	<p>Hahm és mtsai 1999</p> <p>Fukuma és mtsai 2003</p> <p>Im és mtsai</p>

p57 ^{KIP2}	-	– sejtproliferáció (S fázisba való belépés) gátlása	Dauphinot és mtsai 2001 Herrero-Martín és mtsai 2009
ID2	+	– onkogén – Rb-család inaktivációja – sejtciklusba való belépés – sejtnövekedés serkentése – sejt differenciálódás gátlása	Nishimori és mtsai 2002 Baer és mtsai 2004 Hu-Lieskovan és mtsai 2005 Riggi és mtsai 2008 Fukuma és mtsai 2003
CCDN1	+	– onkogén – a Wnt-jelút része – foszforilálja és inaktiválja a RB fehérjét	Dauphinot és mtsai 2001 Fukuma és mtsai 2003 Baer és mtsai 2004 Hu-Lieskovan és mtsai 2005
3. SEJTHALÁLLAL SZEMBENI REZISZTENCIA, APOPTÓZIS-GÁTLÁS			
IGFBP3	-	– sejt apoptózis (IGF-1-függ és -független jelút)	Prieur és mtsai 2004 Miyagawa és mtsai 2008
IGF1	+	– autokrin és parakrin növekedési faktorként működik	Toretsky és mtsai 1997 Scotlandi és mtsai 1998 Riggi és mtsai 2008 Cironi és mtsai 2008
hTERT	+	– sejtöregedés gátlása – immortalizáció	Takahashi és mtsai 2003 Fuchs és mtsai 2004
PLD2	+	– sejtnövekedés, sejtproliferáció – a PDGF-BB-közvetített ERK1/2, Akt és mTOR jelút része	Nozawa és mtsai 2005

c-MYC	+	<ul style="list-style-type: none"> – onkogén transzkripció faktor – sejtciklusba lépés serkentése – S-fázishoz kapcsolt gének transzkripciója 	<p>Hu-Lieskovan és mtsai 2005</p> <p>Dauphinot és mtsai 2001</p> <p>Fukuma és mtsai 2003</p>
CITED2	+	<ul style="list-style-type: none"> – a Wnt-jelút része – a mRNS géntranszkripció szabályozója – AP2 transzkripció faktor koaktivátora 	<p>Baer és mtsai 2004</p> <p>Hu-Lieskovan és mtsai 2005</p> <p>Riggi és mtsai 2008</p>
4. REPLIKÁCIÓS HALHATATLANSÁG			
hTERT	+	<ul style="list-style-type: none"> – sejttöregedés gátlása – immortalizáció 	<p>Takahashi és mtsai 2003</p> <p>Fuchs és mtsai 2004</p>
5. ANGIOGENEZIS			
VEGF	+	<ul style="list-style-type: none"> – angiogenezis 	<p>Fuchs és mtsai 2004</p> <p>Guan és mtsai 2005</p>
PDGF-C	+	<ul style="list-style-type: none"> – növekedési faktor – lehorgonyzás-mentes tumornövekedés – metasztázisképzés – stroma- és érfal-sejtek proliferációja 	<p>Zwerner és mtsai 2001</p> <p>Zwerner és mtsai 2002</p>
6. INVÁZIÓ ÉS METASZTÁZISKÉPZÉS			
CAV1	+	<ul style="list-style-type: none"> – az E-cadherin transzkripció represszorát szabályozza – lehorgonyzás-mentes tumornövekedés 	<p>Tirado és mtsai 2006</p> <p>Kang és mtsai 2007</p> <p>Gangwal és mtsai 2008</p>

CD99	+	<ul style="list-style-type: none"> – sejtmembrán glikoprotein – a neuronális differenciálódás inhibitora – a MAPK jelút szabályozása az ERK1/2 gátlásán keresztül – a sejtproliferáció, sejtmigráció, metasztázisképzés 	Rocchi és mtsai 2010
PDGF-C	+	<ul style="list-style-type: none"> – növekedési faktor – lehorgonyzás-mentes tumornövekedés – metasztázisképzés stroma- és érfal-sejtek proliferációja	Zwerner és mtsai 2001 Zwerner és mtsai 2002
7. VEL CS ÉS GANGLIONLÉC FEJL DÉSE			
NKX2.2	+	<ul style="list-style-type: none"> – transzkripciós faktor – sejtproliferáció – neuronális differenciálódás 	Miyagawa és mtsai 2008 Riggi és mtsai 2008 Cheung és mtsai 2007 Owen és mtsai 2008
TOPK/PBK	+	<ul style="list-style-type: none"> – sejtproliferáció és -motilitás – neuronális marker 	Herrero-Martín és mtsai 2009
EZH2	+	<ul style="list-style-type: none"> – hiszton metiltranszferáz – géncsendesítésben játszik szerepet – neuroectodermális és endothel differenciálódásban szerepet játszó géneket szabályoz 	Burdach és mtsai 2009 Richter és mtsai 2009

CD99	+	<ul style="list-style-type: none"> – sejtmembrán glikoprotein – a neuronális differenciálódás inhibitora – a MAPK jelút szabályozása az ERK1/2 gátlásán keresztül – a sejt proliferációjához, migrációjához, metasztázisképzéshez 	Rocchi és mtsai 2010
CCK	+	<ul style="list-style-type: none"> – autokrin növekedési faktorként m ködik – sejtproliferáció – neuronális marker 	Hu-Lieskovan és mtsai 2005 Carrillo és mtsai 2007 Reubi és mtsai 2004
CITED2	+	<ul style="list-style-type: none"> – a Wnt-jelút része – a mRNS géntranszkripció szabályozója – AP2 transzkripció faktor koaktivátora 	Baer és mtsai 2004 Hu-Lieskovan és mtsai 2005 Riggi és mtsai 2008
7. EGYÉB			
UPP	+	<ul style="list-style-type: none"> – az uridin reverzibilis foszforilálását katalizáló enzim – a pirimidin alapú kemoterápiás vegyületek, pl. 5-fluorouracil aktiválásának kritikus enzime 	Deneen és mtsai 2003a Kim és mtsai 2006
NR0B1/ DAX	+	<ul style="list-style-type: none"> – transzkripció represszor/korepresszor – pontos funkciója ismeretlen 	Riggi és mtsai 2008 Mendiola és mtsai 2006 Kinsey és mtsai 2006

3.4. Genetikai prognosztikai tényezők EFT-ben

A genotípus-fenotípus összefüggések keresése egyidőben a genetika kezdeteivel, segíti a klinikusokat a genetikai eredmények értelmezésében és a betegség lefolyásával kapcsolatos kórjóslatoknak is teret engedhet. Az EFT-betegek tumormintáinak vizsgálata során mind citogenetikai, mind molekuláris genetikai módszerekkel történtek próbálkozások prognosztikai markerek kimutatására.

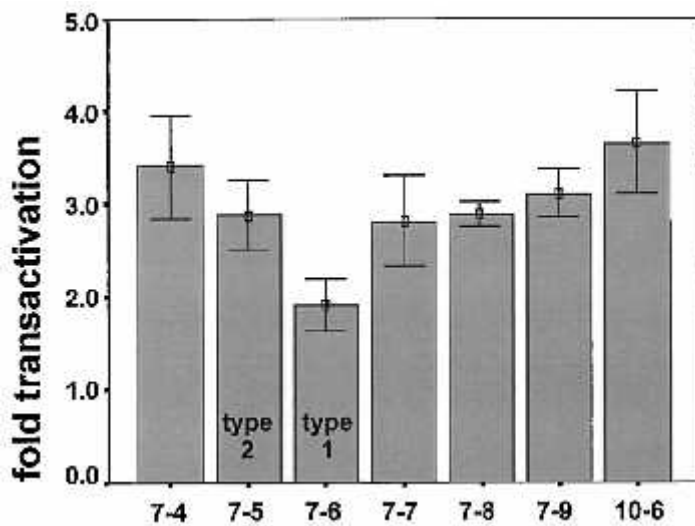
3.4.1. EWSR1-ETS transzlokáció típusok mint prognosztikai tényezők

Zoubek és munkatársai (Zoubek és mtsai 1996) 147 EFT-beteg adatainak felhasználásával végeztek genotípus-fenotípus vizsgálatokat. A betegek tumormintáiban kimutatott EWSR-FLI1 transzlokáció típusok és olyan klinikai jellemzők között kerestek összefüggést, mint a tumor mérete, az életkor, a nem, tumor-lokalizáció, illetve metasztázis jelenléte. Eredményeikben egy szignifikáns összefüggést tudtak kimutatni, minden más klinikai paraméter és transzlokáció típus között nem volt egyértelmű kapcsoltság: 55 lokalizált tumorral diagnosztizált EFT-beteg esetén az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) transzlokációjú (I. típusú) tumoros betegek relapszus mentes túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult a többi transzlokáció típust hordozó beteg túléléséhez képest.

De Alava és munkatársai (de Alava és mtsai 1998) két évvel később publikált, 112 beteg adatait feldolgozó tanulmányában hasonló következésre jutottak. Eredményeik szerint a kiméra transzkriptum típusa (I. típus vs. többi fúziós típus), valamint az életkor, a nem, tumor lokalizáció és a diagnózis felállításakor észlelt stádium (lokalizált/metasztázis jelenléte) között nem volt szignifikáns összefüggés. Ezzel szemben 99 beteg követésének egyváltozós analízise során a teljes túlélés szempontjából a metasztázis jelenléte és az I. típusú transzlokáció is szignifikáns változónak bizonyult, és ezek a változók a többváltozós analízis során is szignifikánsak, valamint függetlenek maradtak. Stádiumok szerint vizsgálva a betegcsoportot, lokalizált tumor (74 beteg) esetén az I. típus mellett az életkor is összefüggött a teljes túléléssel, metasztatikus betegség (25 beteg) esetén azonban a változók egyike sem maradt szignifikáns. A tanulmány szerzői a nem I. transzlokációs típusú EFT-betegeket is

vizsgálták teljes túlélés szempontjából (I. típus vs. II. típus, EWSR1-FLI1(ex. 4-5) vs. többi típus, illetve EWSR1(ex. 8-10)-FLI1 vs. többi típus), de egyik típus, illetve típuscsoport sem mutatott szignifikáns összefüggést a vizsgált klinikai jellemzőkkel (lokalizált tumor, metasztatikus tumor, összes tumor).

Lin munkacsoportja (Lin és mtsai 1999) a statisztikai jelleg megközelítésen túllépve különböző fúziós transzkriptumokat [EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 4), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 9), EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6)] kotranszfektált FLI1-érzékeny luciferáz riporter plazmid vektorokkal HeLa és NIH3T3 sejtekbe. A



kiméra fehérjék transzaktivációját luciferáz aktivitással mérve az EWS(ex 7)-FLI1(ex 6) jelentős transzaktiváció csökkenést tapasztaltak, mely az EWS(ex 7)-FLI1(ex 5) kiméra fehérjék transzaktivációjához képest kb. 50%-os csökkenést mutatott (7. ábra).

7. ábra A luciferáz riporter plazmidokkal és különböző EWSR1-FLI1 fúziós génekkal kotranszfektált HeLa sejtekben észlelt luciferázaktivitás különbségek (Lin és mtsai 1999)

Ewing-sarcoma sejtvonalak riporter plazmiddal való transzfektálása esetén szintén jelentősebb transzaktivációt észleltek a II. típusú transzlokációt hordozó sejteknél, mint az I. típust hordozóknál. Ellenőrizték az I. és a II. fúziós fehérje DNS-kötés affinitását, és az elz leg felhasznált riporternek FLI1-kötés szekvenciájához való kötődésének erősségében nem volt különbség az egyes típusok között, így a transzaktivációban tapasztalt különbségeket az egyes transzlokáció típusok különböző transzformáló aktivitását tették felelőssé. Mivel a két típus között csak az FLI1 gén 6. exonjának meglétében van különbség, feltételezték, hogy a 6. exon egyféle inhibitor

domént kódol, és ez magyarázza az EWS(ex 7)-FLI1(ex 6) transzaktiváció csökkenését. Miután az EWS(ex 7)-FLI1(ex 6) kiméra fehérjénél az EWS(ex 10)-FLI1(ex 6) fehérje transzaktivációja is szignifikánsan magasabb volt, az EWSR1 gén 8-10. exonjának, ezen belül is els sorban a 8. exon által kódolt foszforilációt szabályozó és kalmodulin-köt doménnek transzaktivitás-fokozó funkciót tulajdonítottak.

Több mint egy évtizeddel Zoubek, de Alava és Lin vitákat gerjeszt cikkeinek megjelenése után két nagyobb esetszámú tanulmány jelent meg, melyek eredményei már nem erősítik meg az EWSR1-ETS transzlokáció típusok prognosztikai jelentőségét. Le Deley munkacsoportja (Le Deley és mtsai 2010) az Euro-E.W.I.N.G. 99 prospektív klinikai vizsgálat keretein belül 565 EFT-beteg (ezen belül 296 I. típusú, 133 II. típusú, 91 nem I./II. típusú és 45 EWSR1-ERG transzlokációjú beteg) adatait dolgozta fel prognosztikai faktor analízise során. A vizsgálat nem mutatott ki szignifikáns összefüggést az egyes transzlokáció típusok és a progresszió vagy relapszus között. Egyedül a nem I./II. típusú EWSR1-FLI1 transzlokációk mutattak 1,38-szoros rizikónövekedést progresszió/relapszus szempontjából, de ez sem bizonyult szignifikánsnak. Van Doorninck és társai (van Doorninck és mtsai 2010) hasonlóképpen nem találtak különbséget az I. és a nem I. típusú EWSR1-FLI1/-ERG transzlokációjú EFT-betegcsoport között az ötéves eseménymentes, valamint a teljes túlélés szempontjából. Ugyanakkor van Doorninck munkacsoportja ezen továbblépve elvégzett egy érdekes vizsgálatot: összehasonlították ugyanis saját, 2000 után diagnosztizált EFT-betegekből álló csoportjuknak adatait de Alava (de Alava és mtsai 1998) tanulmányának 1997 előtt diagnosztizált és kezelt betegeinek adataival. Azt találták, hogy míg a 2000 után diagnosztizált betegek 5 éves teljes túlélése az I. és nem I. típusban $83\pm 6\%$ és $79\pm 8\%$, addig de Alava betegcsoportjában az 5 éves teljes túlélés ugyanezen típusokban 70% ill. 20%. A két tanulmány betegcsoportja között a nem I. típus tekintetében észlelt ötéves teljes túlélést érint jelentős különbséget a modern terápiás protokoll hatásosságának javulásával indokolták, egyben magyarázatot adva a 90-es években még prognosztikai tényezőként felmerülő transzlokáció típusok jelentőségének eltérésére a legújabb tanulmányokban.

3.4.2. Szekunder kromoszóma- és/vagy génmódosulások

Az EWSR1-ETS transzlokáció típusok prognosztikai jelentőségének kutatásával párhuzamosan folyt a másodlagos kromoszóma- és génmódosulások prognosztikai jelentőségének vizsgálata EFT-betegeknél. A szekunder vagy kísérő kromoszóma változások és génmutációk megfelelő illetve megengedő háttérrel teremtnek az onkogén kiméra fehérje transzformáló funkciója számára, valamint hozzájárulhatnak a tumoros sejtek szelekciós elnyeréséhez is.

A legjelentősebb, prognosztikai tényezők bizonyuló szekunder genetikai változások közé sorolhatók a p53 és p16^{INK4A} gének mutációi illetve deléciói. A p53 gén mutációi az EFT tumorminták kb. 10%-ában mutathatók ki, és ezen esetek 83%-a misszensz mutáció (de Alava és mtsai 2000). A p16^{INK4A} hemizigóta deléciója a tumorminták 20%-ában van jelen (Honoki és mtsai 2007). Érdekes módon EFT sejtvonalak szinte mindegyikében kimutatható a p53 vagy p16^{INK4A} gének módosulása, mely in vitro szelekciós elnyert enged sejtetni (Wei és mtsai 2000). A p53 mutációja és a p16^{INK4A} hemizigóta deléciója EFT-mintákban független prognosztikai tényezők, melyek a rossz kemoterápiás válasszal hozhatók összefüggésbe, továbbá a p53 és/vagy p16^{INK4A} génekben kimutatott módosulás több tanulmányban is a legjelentősebb negatív prognosztikai tényezők bizonyult, megelőzve a stádiumbeosztást vagy a metasztázis jelenlétét a diagnóziskor (de Alava és mtsai 2000, Huang és mtsai 2005).

Számbeli kromoszóma eltérések az EFT-tumorminták mintegy 77-87%-ában mutathatók ki, és a kromoszómatöbblet gyakoribb a kromoszómahiánynál (Ozaki és mtsai 2001, Ferreira és mtsai 2008, Savola és mtsai 2009). A leggyakoribb számbeli eltérések előfordulási gyakorisággal: az 1q (17-32%), 2 (11-29%), 5p (5-20%), 8 (46-67%), 12 (17-29%), 18 (12%) és 20 (12-19%) kromoszómák többlete, valamint a 7q (25%), 9p (23%), 10 (13-16%), 16q (16-32%) és 19 (12-19%) hiánya (Ozaki és mtsai 2001, Hattinger és mtsai 2002, Ferreira és mtsai 2008, Savola és mtsai 2009). A kromoszóma eltérések átlagos számát tekintve a legkevesebb (átlag=5,8) a primer tumorból származó mintában volt kimutatható, ennél nagyobb számmal fordultak elő kromoszómaszám eltérések a lokális recidívában (átlag=9,5), valamint a metasztázisban (átlag=11,8) (Savola és mtsai 2009). Mindhárom fent említett kutatócsoport közölt statisztikailag szignifikáns összefüggést a genom instabilitása és a túlélés között: Ozaki és munkatársai a <5, valamint a >5 kromoszóma eltérést, Ferreira és Savola

kutatócsoportja pedig a <3, valamint a 3 kromoszómaszám változást mutató tumorminták között talált szignifikánsan hosszabb, valamint rövidebb eseménymentes és teljes túlélést.

Ozaki közleményében (Ozaki és mtsai 2001) az 1q, 2q, 12, és 20 kromoszómák többlete, valamint a 16q és 17p kromoszómák hiánya egyváltozós elemzés során fordított arányosságot mutatott a teljes túlélés tekintetében. A két leggyakoribb kromoszómaszám eltérés többváltozós elemzése során pedig a 16q hiánya jelentős és független prognosztikai faktornak bizonyult. Hattinger kutatócsoportja a 8, 12, 8+12, 1q kromoszómatöbblet, valamint az 1p és 16q kromoszómahiány összefüggéseit vizsgálta az ötéves teljes, illetve eseménymentes túléléssel (Hattinger és mtsai 2002). Az 1q hiány esetében mind a teljes, mind az eseménymentes, a 16q hiány esetében pedig csak a teljes túlélés mutatkozott szignifikánsan rövidebbnek. A 12 és a 8+12 kromoszómatöbblet csak lokalizált EFT-tumor esetén mutatott összefüggést az eseménymentes túléléssel. Egy újonnan közölt tanulmány csak az 1q kromoszómatöbblet esetén talált szignifikánsan rövidebb eseménymentes és teljes túlélést, és ennek metasztázistól és tumormérettől független prognosztikai jelentőségét az elvégzett többváltozós elemzés is igazolta (Mackintosh és mtsai 2012).

Ugyan ezidáig csak két kisebb esetszámú vizsgálaton alapul a telomeráz-aktivitás és telomer hosszúság vizsgálata EFT-mintákban, az eredmények alapján a telomer hosszúság meghatározása ígéretes prognosztikai tényezőnek tekintik. Az első vizsgálatok egyikében, bár a primer EFT-tumorban nem igazolódott a telomeráz-aktivitás és az eseménymentes túlélés között összefüggés, a terápia alatti telomeráz-aktivitás követése során már szignifikánsnak bizonyuló összefüggést sikerült kimutatni a magas telomeráz aktivitás és az alacsonyabb ötéves eseménymentes túlélés között (Ohali és mtsai 2003). E közlemény szerint a telomeráz-aktivitás emelkedés a terápia alatt és az utánkövetés során mintegy 2-15 hónappal előbb jelezte a betegség relapszusát. Egy másik kutatócsoport szintén jelentős telomeráz-aktivitás növekedést észlelt a betegség progressziója során: a primer Ewing-sarcomás minták 12,5%-ában, míg a metasztázisok 100%-ában mértek telomeráz-aktivitást (Sotillo-Pineiro és mtsai 2004). Az eseménymentes túlélés csökkenése és a telomeráz-aktivitás növekedése közötti kapcsolat ebben a vizsgálatban is szignifikánsnak bizonyult, bár EFT

tekintetében prognosztikai értékét csökkenti, hogy a betegcsoportba osteosarcomás betegeket is bevontak.

Avigad és munkatársai primer Ewing-sarcomás minták és perifériás vérből származó limfociták telomer hosszát hasonlították össze (Avigad és mtsai 2007). Eredményeik nemcsak azt bizonyítják, hogy a tumorsejtek telomer hossz csökkenése szoros összefüggést mutat az eseménymentes túlélés csökkenésével, de a több mint két kromoszóma eltéréssel vagy random aneuploidiával meghatározott genetikai instabilitás is szignifikáns kapcsolatot mutatott a telomer hossz változásával. A telomer hosszának csökkenése primer tumorban a többváltozós elemzés során is szignifikáns prognosztikai tényező maradt. A közlemény szerint az igazolt rövidebb telomer hossz mintegy 5,3-szorosára növelte a betegek rizikóját a betegség kiújulására.

3.5. Molekuláris diagnosztikai módszerek az EFT differenciáldiagnosztikájában

A differenciálatlan vagy rosszul differenciált sejteket tartalmazó kis kereksejtes tumorok hisztológiai képe fénymikroszkóp alatt kis, kerek sejteket mutat, melyek nagy, hematoxilín-eozinnal sötétkéken festődő sejtmaggal és keskeny citoplazma-szegéllyel bírnak. Az azonos morfológiájú, primitív sejtekből fakadóan a felsorolt tumorok megkülönböztetése hisztológiai kép alapján különösen nehéz, miközben a különböző terápiás stratégiák és az eltérő prognózis a kis kereksejtes tumorok egyértelmű klasszifikációját követeli meg. Ez a differenciál-diagnosztikai kihívás az utóbbi évtizedekben immun-hisztokémiai és molekuláris diagnosztikai eszközökkel bővítette a patológia eszköztárát. Az immun-hisztokémiai módszerekkel strukturális vagy funkcionális fehérjék, glikoproteinek és komplex szénhidrát molekulák kimutatása válik lehetővé a sejtekben, illetve az extracelluláris térben, ezzel segítve a sejtek differenciálódásának meghatározását. A molekuláris diagnosztika ezzel szemben specifikusabb információt nyújt, elsősorban azokban az esetekben, amikor ismertek a tumorra specifikus kromoszóma- vagy génmódosulások.

A Ewing-családba tartozó tumorok hátterében az adott tumorcsaládra specifikus transzlokációk állnak, melyek megnyitják az utat a molekuláris diagnosztikai módszerek előtt. Azonban a sokféle, különböző gyakoriságú transzlokáció, az egyes

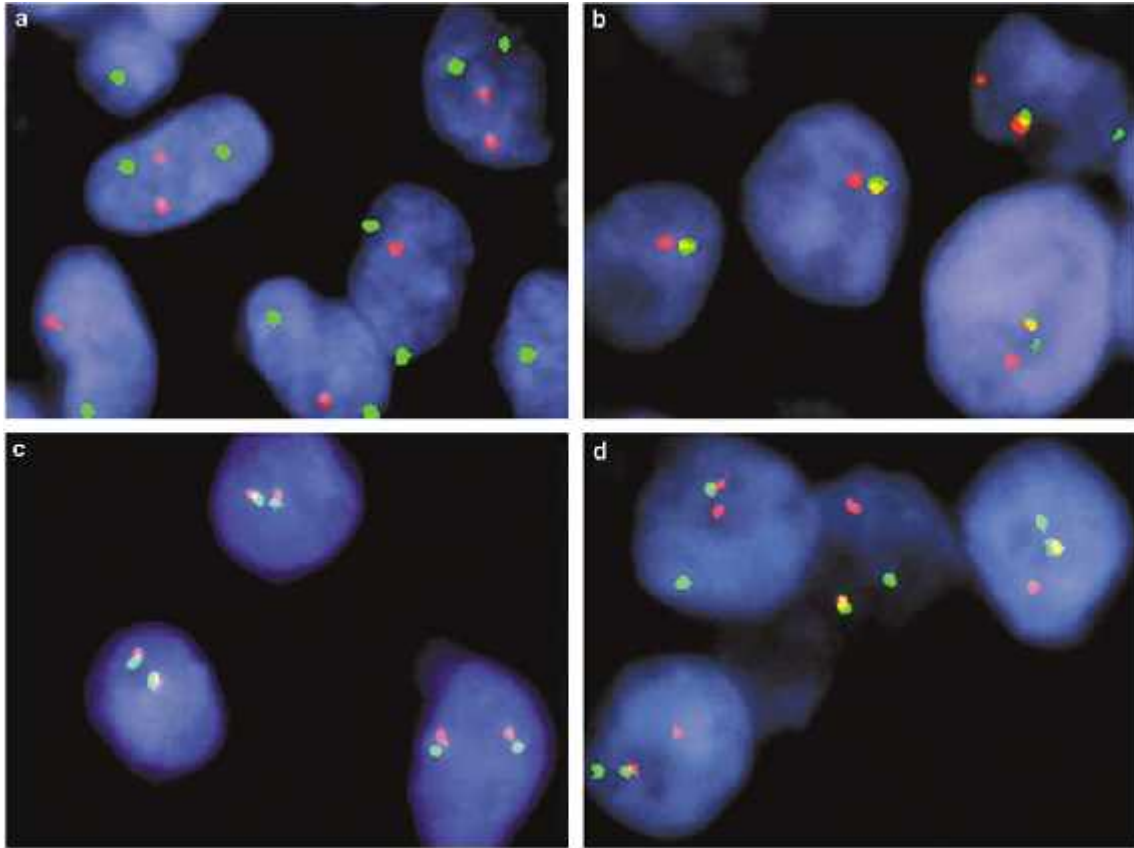
transzlokációkon belüli, törésponttól függ heterogenitás, továbbá a rendelkezésre álló, különböző archiválási technikákon átesett, és ebből fakadóan változó minőségű tumorminták újabb és újabb kihívás elé állítják a gyors, specifikus és szenzitív diagnosztikai módszer igényével fellépő szakembert.

Ebben a fejezetben áttekintem az EFT diagnosztikájában alkalmazott legfontosabb genetikai módszereket, mint a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) és a reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) eljárásokat. Az újabb, egyelőre még inkább kutatási stádiumban lévő, főként microarray technikákon alapuló alternatív diagnosztikai módszereket (Skotheim és mtsai 2009, Luo és mtsai 2012) nem tárgyalom részletesebben.

3.5.1. FISH

A fluoreszcens in situ hibridizáció molekuláris citogenetikai analízis, mely fluoreszcens festékekkel jelölt kromoszóma specifikus, komplementer DNS- (ritkábban RNS-) szekvenciák, ún. próbák kötésének vizsgálatából áll. A Ewing-családba tartozó tumorok diagnosztikájában kétféle DNS-próba használata terjedt el. A „break apart” próbák, melyek centromerikusan és telomerikusan különböző fluoreszcens festékek kötnek, a transzlokációban résztvevő EWSR1 gén nagy részét ölelik át, lefedve az összes lehetséges töréspontot a kromoszómán. EWSR1 transzlokációt nem hordozó tumorsejtek esetében a fluoreszcens mikroszkóp által készített képen (8. ábra) a két fluoreszcens jel egymáshoz közel, transzlokáció-pozitív esetekben pedig egymástól távol ábrázolódik.

Az általában „házipróbák”, a laboratóriumok által tervezett ún. fúziós-két, a transzlokációban résztvevő génpár mindkét tagjára (általában az EWSR1 és FLI1 génekre) tervezett, különböző fluoreszcens festékekkel jelölt próbák használatakor azonban az elzártsággal ellentétes fluoreszcens képet kapunk: a transzlokációt nem hordozó tumorsejtek esetében egymástól távoli, transzlokáció-pozitív esetekben pedig egymáshoz közel lévő fluoreszcens jelet kapunk.



8. ábra Reprezentatív képek fúziós (a, b), valamint „break apart” próbát (c, d) alkalmazó FISH vizsgálat eredményér l EWSR1-transzlokáció negatív (a, c) és pozitív (b, d) tumorsejteken (Bridge és mtsai 2006)

A kétféle módszer szenzitivitása és specifikussága az EFT diagnosztikájában azonos, 91%, valamint 100%, pozitív prediktív értékük 100%, negatív prediktív értékük pedig 93% (Bridge és mtsai 2006). A FISH-vizsgálat el nyéhez tartozik még a magas szenzitivitáson és specifitáson kívül a diagnosztika gyorsasága, alkalmassága frissen fagyasztott és paraffinba ágyazott minták vizsgálatára is, valamint az a tulajdonsága, hogy szövetekre illetve sejtekre lokalizálható a kromoszóma eltérés. Hátránya azonban, hogy kereskedelmi forgalomban csak korlátozott számú próba kapható, így szükség lehet házi tervezés próbára is; viszonylag nagyobb a mintaigénye a molekuláris genetikai vizsgálatoknál; szuboptimális min ség mintáknál az eredmény értelmezése nehézségekbe ütközhet, valamint a FISH-terminológia nem egységes a laboratóriumok között (Bridge és Cushman-Vokoun 2011).

Említésre méltó még, hogy a fúziós próbák csak bizonyos génpárok által alkotott (leggyakrabban az EWSR1-FLI1) transzlokációk kimutatására alkalmasak, és más, pl. a szintén gyakori EWSR1-ERG transzlokáció jelenlétében álnegatív eredményt adhatnak. Ezzel szemben a „break apart” próbák az összes EWSR1 gén által alkotott transzlokációnál pozitív eredményt adnak, de nem alkalmasak a transzlokációs partner meghatározására, és mivel többféle tumor háttérben is állhat EWSR1-transzlokáció, az EFT diagnosztikájára csak bizonyos megszorításokkal, más vizsgálatokkal (pl. hisztológia, immun-hisztokémia) együtt alkalmas.

3.5.2. RT-PCR

A molekuláris genetikai diagnosztika az egyes EFT-specifikus transzlokációk töréspont függ heterogenitása, valamint a lehetséges töréspont régiók nagysága miatt RNS-alapú. A különböző lehetséges töréspontok által közrefogott, vizsgálandó génrészlet hossza ugyanis molekuláris genetikai szempontból nagynak számít: az EWSR1-FLI1 transzlokáció esetén az intronok hosszának figyelembevételével pl. közel 50 000 bázispár. Ezzel szemben a leghosszabb lehetséges EWSR1-FLI1 transzkriptum (EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 4)) az EWSR1 7. és FLI1 9. exonokra tervezett primerek esetén viszont csak 750-800 bp hosszú, mely jó minőségű RNS esetén RT-PCR (ill. szükség esetén nested PCR) által amplifikálható, és jó eséllyel kimutathatóvá válik. A módszer ráadásul érzékeny, kisebb mintaigény a FISH-hez képest; alkalmas lehet minimális reziduum, disszeminált betegség vagy relapszus korai monitorozására is; szintén gyors diagnózishoz vezet; a pozitív vizsgálati eredmény esetén az EFT diagnózisa biztos és az átíródó szekvencia pontos ismerete a diagnózisalkotáson túlmutató többletinformációt biztosít.

Ugyanakkor ennek a vizsgálati módszernek is vannak komoly korlátai: bár az RT-PCR a FISH-hez hasonlóan alkalmas archív minták vizsgálatára is, a minta minősége, a fixálás és tartósítás módja meghatározó lehet az eredményesség szempontjából, lévén az RNS gyorsan bomló molekula, és az RNS degradáció útját állhatja hosszabb transzkriptumok amplifikációjának. Ezen túl a transzlokációk sokfélesége rendkívül megnehezíti a diagnózis biztos kizárását, mivel az RT-PCR esetén is csak azokat az átíródó transzkriptumokat tudjuk kimutatni, melyekre a

primerek tervezve lettek, a legtöbb laboratórium pedig els sorban a leggyakoribb transzlokációk vizsgálatát végzi rutinszer en, így ritkább transzlokációk, esetleg szokatlan transzlokáció típusok álnegatív eredményt adhatnak. E problémakörre adhatnak megoldást a jöv ben a microarray alapú vizsgálatok. Az RT-PCR vizsgálat metodikai nehézségei közé tartozik még a módszer érzékenységéb l fakadó kontaminációveszély, mely a minta min ségét ellen rz pozitív kontrollon kívül negatív kontroll alkalmazását teszi szükségessé, valamint a szekvenálás, specifikus próbával való hibridizáció, vagy más vizsgálatok alkalmazásának igénye, mely igazolja a vizsgálati eredmény, az amplifikált szekvencia specifikus voltát.

A módszerek áttekintéséb l kit nik, hogy egyenl re nem rendelkezünk ideális, minden szempontból kielégít diagnosztikai módszerrel az EFT igazolására vagy kizárására. Míg frissen fagyasztott minták vizsgálatánál inkább a ritka transzlokációk vizsgálata okozhat problémát, addig a több éves vagy évtizedes paraffinos metszetek feldolgozásánál a leggyakoribb transzlokációfajták igazolása is komoly nehézségekbe ütközhet. Mindegyik alkalmazott módszernek vannak el nyei és hátrányai egyaránt, és ilyen szempontból inkább kiegészítik egymást, semhogy versengenének. Ugyanakkor az EFT diagnosztika hiányosságai állandó kihívást jelentenek, és ennek köszönhet en újabb és újabb metodikai közlemények látnak napvilágot, melyek vagy a meglév módszereket csiszolgatják, vagy újszer vizsgálati módok felé veszik az irányt.

3.5.3. Molekuláris genetikai metodikatörténet az EFT diagnosztikájában

3.5.3.1. Frissen fagyasztott minták vizsgálata

A legels EFT-diagnosztika céljából alkalmazott molekuláris genetikai módszerek is ugyanzt a metodikai sémát követték, amit napjainkban is használunk: a reverz transzkripciót, mely során az RNS-r l cDNS íródik át, PCR technikán alapuló amplifikáció követte, majd a sokszorosított cDNS szekvenciát a PCR-termék kimutatása céljából agaróz gélen futtatták (Delattre és mtsai 1992, Zucman és mtsai 1993, May és mtsai 1993b, Sorensen és mtsai 1993, Sorensen és mtsai 1994, Giovannini és mtsai 1994, Delattre és mtsai 1994, Barr és mtsai 1995, Ida és mtsai 1995, Thorner és mtsai 1996, Minoletti és mtsai 1998, Kumar és mtsai 1999, Naito és mtsai 2000, Dagher és

mtsai 2001). Ezt követte a szekvenálás, vagy specifikus próbákkal való hibridázálás, mely igazolta, hogy az amplifikált szekvencia valóban a keresett kiméra transzkriptum.

Az EFT diagnosztikájában ma alkalmazott módszerek az esetek nagy részében csupán korszer sődtek a gyorsabb és pontosabb kimutatás érdekében. Így például megjelent a nested PCR módszere, melynek során az els (RT-)PCR-t követ en a PCR-terméket egy újabb amplifikálásnak vetették alá egy új, bels keret-primerpár segítségével (Downing és mtsai 1993, Zoubek és mtsai 1994, Dockhorn-Dworniczak 1994, Meier és mtsai 1998, Le Deley és mtsai 2010). Ezáltal nemcsak a fúziós transzkriptum kimutatásának érzékenységét, de az újabb szekvencia-specifikus primerek által az amplifikáció specifikusságát is növelve. A multiplex PCR-technika különböz EWSR1-FLI1 transzkriptumok (Zucman-Rossi és mtsai 1998, Wang és mtsai 2007), különböz EWSR1-ETS (Kojima és mtsai 2002, Wang és mtsai 2007) és/vagy különböz szolid tumorokhoz kötött transzlokációk (Peter és mtsai 2001, Le Deley és mtsai 2010) egyszerre történ amplifikálását t zte ki célul, ezzel id t, mintát és reakcióelegyet takarítva meg.

Az egyes EWSR1-ETS transzlokációk, illetve a transzlokáció típusok megkülönböztetésére és azonosítására, valamint az id igényes szekvenálás kiváltására az alábbi módszerekkel történtek még próbálkozások: restriktív enzimekkel való emésztés (Meier és mtsai 1998), multiplex real-time PCR EWSR1-specifikus oligonukleotid próbával (Peter és mtsai 2001), a PCR-termék hosszúságának mérése Bioanalyzer segítségével (Kojima és mtsai 2002, Yoshino és mtsai 2003), valamint kvantitatív RT-PCR reakció SYBR green festékkel történ olvadáspont-analízissel (van Doorninck és mtsai 2010).

3.5.3.2. Paraffinos minták vizsgálata

Az EWSR1-ETS transzlokációk közötti, valamint az egyes transzlokációkon belüli heterogenitáson túl formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták esetén a romló RNS-min séggel, els sorban az RNS-degradációból fakadó töredezettséggel újabb metodikai nehézségek kerültek el térbe. Az archív minták vizsgálata még inkább megkövetelte a megfelelő szenzitivitást és specifitást az alkalmazott módszerekt l. Ennek megfelelő en a nested PCR alkalmazása archív mintákon már a kezdetekt l jelen van (Adams és mtsai 1996, Scotlandi és mtsai 1996, Park és mtsai 1998, Hisaoka és

mtsai 1999, O'Sullivan és mtsai 2001, Bridge és mtsai 2006, Le Deley és mtsai 2010), bár a hagyományos PCR technika alkalmazására is van jópár példa (Quezado és mtsai 1997, Hill és mtsai 2002, Fritsch és mtsai 2003, Stegmaier és mtsai 2004, Qian és mtsai 2005).

Az RNS-töredezettség okozta nehézségek leküzdésére, és a szenzitivitás fokozására használatossá vált az EWSR1-FLI1 transzlokáció típusok több primerpár segítségével történő amplifikációja, melyre egyes kutatócsoportok esetében több különálló PCR keretében (Stegmaier és mtsai 2004), másoknál pedig egyetlen multiplex PCR keretében került sor (Terrier-Lacombe és mtsai 2009). Ugyanakkor arra is van példa, hogy az eltérő transzlokációk amplifikálása multiplex, az EWSR1-FLI1 hosszabb kiméra transzkriptumait pedig több nested PCR keretében sokszorosították (Le Deley és mtsai 2010).

A real-time PCR alkalmazására is akadt példa (Lewis és mtsai 2007), lévén ez a módszer jóval érzékenyebb a hagyományos gélelektroforézissel történő kimutatásnál, és a két leggyakoribb EWSR1-FLI1 típusra tervezett próbákkal történő azonosítás gyorsabb is. A ritkább EWSR1-FLI1 transzlokáció típusok kimutatását SYBR green alapú olvadáspont-analízis révén oldották meg, ami azonban nem nyújtja a specifikus azonosítás lehetőséget.

4. Célkit zések

Jelen munka során a következ célokat t ztem ki:

➤ Molekuláris genetikai módszerek kidolgozása és Magyarországon els ként való beállítása a Ewing-tumorok családjának diagnosztikájában az EWSR1-FLI1 és az EWSR1-ERG transzlokációk azonosítására.

➤ Az RNS alapú, új, (Magyarországon és külföldön ilyen formában eddig nem alkalmazott) multiplex fluoreszcens PCR és lézer indukált kapilláris elektroforézis alapú metodika alkalmazása frissen fagyasztott EFT-minták esetében.

➤ Az RNS alapú, új, multiplex fluoreszcens PCR és lézer indukált kapilláris elektroforézis alapú metodika alkalmazása formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-mintákban.

➤ A Semmelweis Egyetem, Ortopédiai Klinika Tumorbankjában tárolt EFT-minták feldolgozását követ en az egyes EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációk és transzlokáció típusok eloszlásának meghatározása a magyar betegpopulációban.

➤ Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációk magyar betegpopulációban észlelt spektrumának összevetése nemzetközi adatokkal.

➤ Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációs típusok szerepe a Ewing-tumorok családjának klinikai megnyilvánulásában (genotípus-fenotípus összefüggések keresése).

➤ A többszörös fúziós transzkriptumok szekvenciájának és gyakoriságának meghatározása a Ewing-sarcoma családba tartozó tumorok esetében.

➤ Az egyazon EFT-mintában el forduló multiplex fúziós transzkriptumok háttérében álló jelenség jellemzése, valamint az EFT patomechanizmusában feltételezhet szerepének megítélése saját eredményeim és a szakirodalmi adatok alapján.

5. Módszerek

5.1. Betegcsoport

Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (ETT TUKEB) engedélyével (No.ad.22-3/2007-1018EKU) 1996 és 2006 között mintavételre került 22 beteg 1 származó 23 frissen fagyasztott, valamint 47 beteg 1 származó 60 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintát vontunk be a retrospektív vizsgálatba. Ezzel összesen 48 beteg 1 származó 83, többnyire ES/pPNET szövettani diagnózissal bíró mintát dolgoztunk fel. Az összes minta a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján működő Tumorbankból származik, Prof. Szendrői Miklós engedélyével.

A Ewing-sarcoma és a perifériás primitív neuroektodermális tumor diagnózisának kialakítása a klinikai kórképen, valamint a WHO által meghatározott szövettani kritériumok alapján elvégzett hisztopatológiai vizsgálatokon alapult. A vizsgálatba a 75, szövettanilag egyértelmű Ewing-sarcomának/pPNET-nek tartott minta mellett 8, kis kereksejtes tumorként diagnosztizált tumormintát is bevontunk, melyek esetében felvetődött az ES/pPNET szövettani gyanúja.

A vizsgálat során 25 beteg 1 több mintát is feldolgoztunk. Általában egy mintavételből 1 származó mintákat csak egyszer vizsgáltunk, tehát a többszörös minták több mintavételből származnak, kivéve azokat az eseteket, ha a minta frissen fagyasztott és paraffinba ágyazott módon is elérhető volt. Ezeket a mintákat, mivel a kétféle mintát különböző módszerekkel vizsgáltuk, valamint munkám fontos része volt a metodika kialakítása is, akkor is bevontuk a vizsgálatba, ha azonos mintavételből származtak.

Egyazon mintavételből rendelkezésre álló több tumorminta esetén a fókuszként paraffinos mintáknál a mintában látható tumorrésztlet nagysága volt a fő választási szempont, amennyiben ez jellemző tekintetében a minták között jelentős különbség adódott. Abban az esetben, ha a minták között jelentős különbség nem volt látható, a vizsgált mintát véletlenszerűen választottuk ki.

Ez az első, magyar EFT-betegcsoporton alapuló molekuláris genetikai vizsgálat, mely közzésre került.

5.2. RNS-izolálás

5.2.1. RNS-izolálás frissen fagyasztott mintákból

Az átlagosan 50-100 mg frissen fagyasztott mintából a homogenizálást követően Trizol reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével savas guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform eljárással, a felhasználási útmutató alapján izoláltam RNS-t. A mintákból kivont RNS minőségi és mennyiségi vizsgálata SmartSpec™ Plus spektrofotométer (Bio-142 Rad, Hercules, CA) segítségével történt. Az izolált RNS-ek mennyisége 194 ng/μl és 4812 ng/μl között mozgott. A magasabb RNS koncentrációjú oldatokat a reverz transzkripció elvégzésésképpen 200 ng/μl-ra hígítottam, majd -80 °C-on tároltam a további felhasználásig.

5.2.2. RNS-izolálás formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákból

Paraffinba ágyazott minták esetén négy, egyenként 10 μm vastagságú metszetet készítettünk, melyekből a High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) vagy a PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával, a felhasználási útmutató szerint mRNS-t izoláltam.

Az FFPE minták deparaffinizálása a kit felhasználási útmutatójának kisebb módosításával, az alábbi módon történt. A paraffinba ágyazott mintákból készített négy 10 μm vastagságú metszet deparaffinizálását egy csőben végeztem. Első lépésként 1300 μl xilolot adtam a metszetekhez, majd 57°C-on 5 percig tartó inkubálás után maximális (14000g) fordulatszámon 2 percig centrifugáltam, végül a felülúszót pipettával leszívtam. A xilolos mosást még egyszer megismételtem. Ezt követően 1300 μl etanolot adtam a metszetekhez, 2 percen keresztül maximális fordulatszámon centrifugáltam a mintákat, majd a felülúszót pipettával leszívtam. Az etanolos mosást tartalmazó lépés megisméltése után 55°C-on szárítottam a mintákat. Proteinázos emésztés céljából a High Pure RNA Paraffin Kit útmutatójának megfelelően (Tissue Lysis Buffer, 10% SDS és Proteináz K tartalmú) reakcióelegyet másfélszeresét adtam minden egyes, négy metszetet tartalmazó csőbe, majd 55°C-on egy éjszakán át inkubáltam a mintákat. Ezt követően a High Pure RNA Paraffin Kit felhasználási útmutatójának megfelelően jártam el.

Az izolált RNS koncentrációját SmartSpecTM Plus spektrofotométeren ellen ríztük, és csak a 20 ng/μl, vagy annál magasabb koncentrációjú RNS-eket vontuk be vizsgálatunkba. Az izoláció folyamatának végeztével az RNS-t -80°C-on tároltuk a további felhasználásig.

5.3. Primerek tervezése

A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákból izolált RNS-ek jelentős degradációja miatt olyan külső és belső primerkészlet tervezése volt a célunk, mely (1) lehetővé teszi az összes lehetséges EWSR1-FLI1 vagy EWSR1-ERG transzlokáció típusú amplifikálását, (2) amplikonjainak hossza igazodik az RNS töredezettségéhez, valamint (3) a belső primerkészleten belüli forward primerekhez tartozó lehetséges amplikonok hossza legalább 2-3 bp különbséget mutat, mely az amplikonok fluoreszcens kapilláris elektroforézissel való megkülönböztetésének feltétele. A FFPE mintákban a feltételezett átlagos RNS-hosszúság –a degradáció okozta töredezettség miatt– kb. 150-200 bázispár, így a primerek tervezésekor legfeljebb 150 bázispárnyi amplikonok sokszorosítása volt a cél. Ennek feltétele pedig az volt, hogy az EWSR1 gén 7-10. exonjainak mindegyikére, az FLI1 gén 4-9. exonjainak pedig a nagy részére primert kellett tervezni.

A primerek tervezésénél szempont volt még természetesen a PCR és multiplex PCR szempontjából optimális primerek kiválasztása, tekintettel a primerek másodlagos szerkezetének és egymás közötti interakcióinak lehetőség szerinti elkerülésére, a megfelelő GC-arány biztosítására, valamint a hasonló olvadáspontú ($T_m < 5-6^\circ\text{C}$) primerek keresésére.

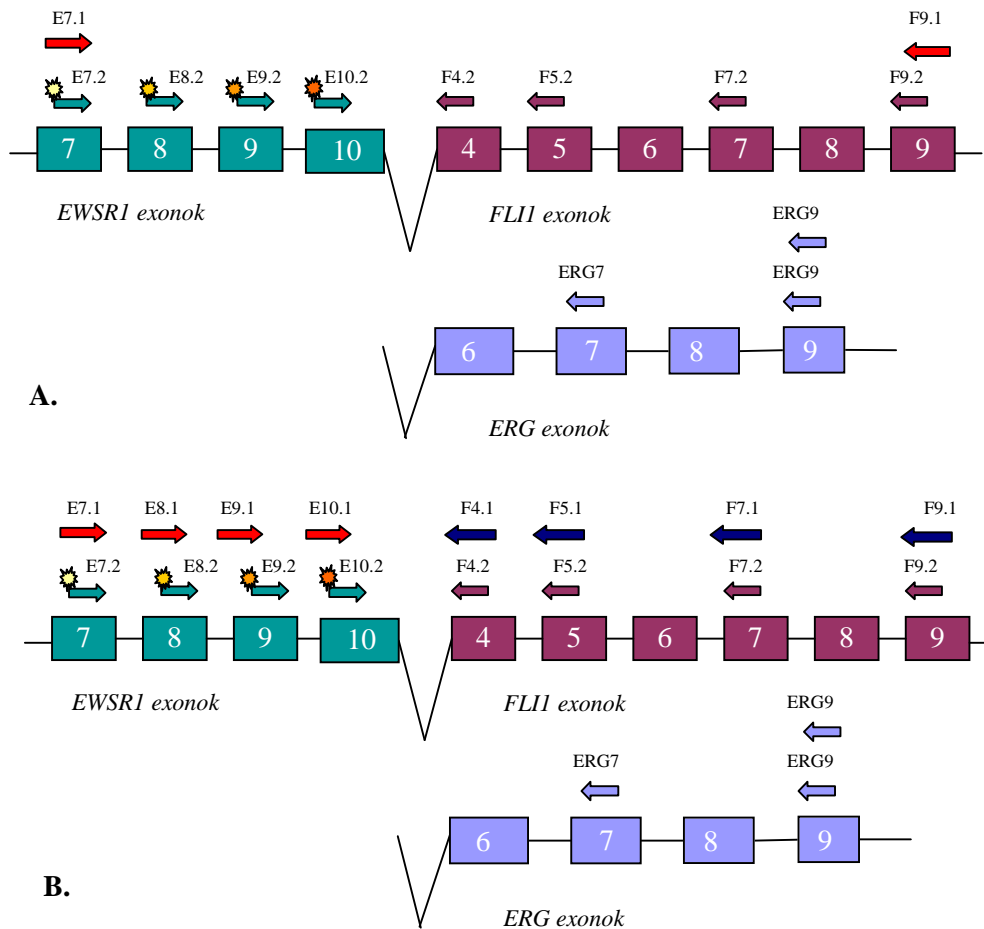
A primereket a *MIT Primer3* on-line és a *FastPCR primer design and sequencing* programmal terveztük. A primerek másodlagos szerkezetét, valamint a primerek közötti lehetséges keresztreakciókat az *IDT Oligo Analyzer 3.1* (Integrated DNA Technologies, USA) és a *NetPrimer* (PREMIER Biosoft International, USA) programok segítségével ellen ríztük. A primerek szekvenciájának specifikusságát a *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) szekvencia-adatbázisában ellen ríztük, a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) on-line program felhasználásával.

A fent említett elveknek megfelelően, a szakirodalomban leírt (Zucman és mtsai 1993, Sorensen és mtsai 1994, Zoubek és mtsai 1994, Giovannini és mtsai 1994, Zucman-Rossi 1998) töréspont régiók lehetséges kombinációinak figyelembevételével hét, három forward és négy reverse primerkészletet terveztünk. Az EWSR1 gén 7-10. exonjaira négy-négy primerből álló küls (EWSR1 A) és bels (EWSR1 B) forward primerkészletet terveztem. A EWSR1 B primerkészlet primereit a lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis által való azonosíthatóság kedvéért fluoreszcens (6FAM, VIC, NED vagy PET) festékkel jelöltük. Az FLI1 gén 4, 5, 7. és 9. exonjaira szintén négy-négy primerből álló küls (FLI1 A) és bels (FLI1 B) reverse primerkészletet, az ERG gén 7. és 9. exonjaira pedig két forward primerből álló primerkészletet (ERG) terveztünk. Végezetül az RNS min ségi kontrolljaként szolgáló -aktin (ACTB) housekeeping génre egy küls (ACTB A) és egy bels (ACTB B) primerpár lett tervezve. A kiválasztott primerkészletek szekvenciáját és jellemzőiket a 2. táblázatban tüntettük fel. A transzlokációban résztvevő génekre tervezett primerek kötődési helyének vázlatos szemléltetése az 9. ábrán látható. A kiválasztott primerek hosszúsága 18-27 bp, GC-aránya 40-61%, és olvadáspontjuk 53°C és 58,7°C közé esik.

2. Táblázat A vizsgálatban felhasznált primerek jellemzői

Primer	Szekvencia	Hossz (bp)	Molekulasúly (g/mole)
EWSR1 A 5' primerek Küls primerkészlet	E7.1 TCCTACAGCCAAGCTCCAAG	20	6031.0
	E8.1 AAGAGGGGGATTTGATCGTGG	21	6606.3
	E9.1 GAGAGCGAGGTGGCTTCAAT	20	6222.1
	E10.1 CATGGATGAAGGACCAGATCTT	22	6783.5
EWSR1 B 5' primerek Bels primerkészlet	E7.2 6FAM-ATATAGCCAACAGAGCAGCAG	21	6994.7
	E8.2 VIC-GAGGCATGAGCAGAGGTG	18	6203.7
	E9.2 NED-GTGGCTTCAATAAGCCTGGTG	21	7027.2
	E10.2 PET-GGATGAAGGACCAGATCTTGAT	22	7373.5
FLI1 A 3' primerek Küls	F4.1 TCCTCCTTGTTTCATTTTACACAGTTCC	27	8102.3
	F5.1 CGTGAGGATTGGTCGGTGT	19	5930.9
	F7.1 GGGCCGTTGCTCTGTATTCT	20	6106.0

primerkészlet	F9.1 GAGAGCAGCTCCAGGAGGAA	20	6225.1
FLI1 B	F4.2 TTCTGGAAAAAGGATGTGTCG	21	6525.3
3' primerek	F5.2 GTGAGGATTGGTCCGGTGTG	19	5970.9
Bels	F7.2 CTGTATTCTTACTGATCGTTTGTGC	25	7620.0
primerkészlet	F9.2 GCAGCTCCAGGAGGAATTG	19	5877.9
ERG	ERG7 GTGGAAGGAGATGGTTGAGC	20	6302.1
3' primerek	ERG9 AGGAACTGCCAAAGCTGGAT	20	6175.1
ACTB A	ACTB1.1 CACCATGTACCCTGGCATT	19	5723.8
5' és 3' primerek	ACTB2.1 TCGTCATACTCCTGCTTGCT	20	6009.9
Küls primerk.			
ACTB B	ACTB1.2 PET-CACCATGTACCCTGGCATT	19	6273.8
5' és 3' primerek	ACTB2.2 GATCCACACGGAGTACTTGC	20	6102.0
Bels primerk.			



9. ábra Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációkra tervezett primerek bekötése (A) frissen fagyasztott és (B) paraffinba ágyazott minták vizsgálata során. Az egyes primerpárok által amplifikált PCR-termékek várható hosszát lásd a 3-4. táblázatban.

5.4. RT-PCR és multiplex PCR frissen fagyasztott mintákból származó RNS esetén

5.4.1. Monoplex RT-PCR

Az RT-PCR során a GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) felhasználásával 40-60 ng teljes RNS-t írtunk át és sokszorosítottunk. A 7.5 µl végtérfogatú reakcióelegy 2 mM MgCl₂-ot, 200 µM dNTP-keveréket (dATP, dCTP, dGTP és dTTP), az E7.1-F9.1 vagy E7.1-ERG9 primerpárokból 0.075 µM-t, valamint 1.5U RNáz Inhibitort, 0.375U AmpliTaq Gold DNA polimerázt és 2.25U MultiScribe reverz transzkriptázt tartalmazott. A PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) típusú készülékben az alábbi PCR körülményeket alkalmaztuk. A reverz transzkripció 42°C-on 12 percig tartott, majd 10 perces 95°C-on történő polimeráz aktivációs lépést követően 40 kétlépéses ciklusból álló amplifikálás következett, mely 94°C-on 20 másodperc denaturációból, továbbá 1 perces 60°C-os anellálásból és egyidejű extenzióból állt, végül az RT-PCR reakció 7 perces 72°C-on történő anellálással és lánchosszabbítással ért véget.

5.4.2. Nested multiplex PCR

A nested multiplex PCR-hez szükséges reakcióelegy 7,5 µl végtérfogatban az alábbi összetevőket tartalmazta: 0.3 µl RT-PCR végtermék, 2 mM MgCl₂, 200 mM dNTP-keverék (dATP, dCTP, dGTP és dTTP), 0.15 µM a fluoreszcens festékkel jelölt EWSR1 B és az FLI1 B vagy ERG belső primerkészletekből, valamint 0.375U AmpliTaq Gold DNS polimeráz (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) enzim. A multiplex PCR körülményei a következők voltak: 95°C-on 10 perc AmpliTaq Gold DNS polimeráz aktiválás, majd 20 másodperces 94°C-on való denaturálásból, valamint 60°C-os 1 perces anellálásból és lánchosszabbításból álló 40 kétlépéses ciklus, melyet 7 perces 72°C-on történő végső anellálás és extenzió zárt le.

5.5. RT-PCR és PCR paraffinba ágyazott mintákból származó RNS esetén

A paraffinba ágyazott tumormintákból izolált, er sen degradált RNS esetén a frissen fagyasztott mintáknál leírt monoplex RT-PCR módszer a molekuláris diagnosztika hatékonyságának növelése érdekében módosítást igényelt. Az EFT háttérében álló transzlokációk degradált RNS-mintán alapuló azonosításának igénye multiplex primerkészlet használatát tette szükségessé már az RT-PCR folyamata során, mely biztosította a töredezett RNS maximum 150-200 bázispárnyi hosszúságú cDNS formájában történő átírását.

5.5.1. Multiplex RT-PCR

A reverz transzkripció és amplifikálás paraffinba ágyazott mintákból izolált RNS esetén is a GeneAmp RNA PCR Kit felhasználásával történt. A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy összetétele az alábbi volt: 60-150 ng RNS, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-keverék; 0.3 µM az EWSR1 A és FLI1 A vagy ERG primerkészletekből, valamint 0,15 µM ACTB A primerekből; 2U RNáz inhibitor, 0.5U AmpliTaq Gold DNS polimeráz és 4U MultiScribe reverz transzkriptáz. Az RT-PCR során a következő körülményeket alkalmaztuk: 12 perces átírás 42°C-on, majd 40 ciklus amplifikálás 95°C-on történő 30 másodperces denaturációval, 60°C-os 45 másodperces anellálással és 72°C-os 40 másodperces extenzióval, végül 72°C-on történő 15 perces végső lánchosszabbítás következett.

5.5.2. Nested multiplex PCR

A nested multiplex PCR során a megelőző RT-PCR termékéből 0,6 µl-t felhasználva az alábbi 7,5 µl végtérfogatú reakcióelegyet állítottuk össze: 2 mM MgCl₂, 200 mM dNTP-keverék, 0.13 µM a fluoreszcens festékkel jelölt EWSR1 B és az FLI1 B vagy ERG belső primerkészletekből, továbbá 0.375U AmpliTaq Gold DNS polimeráz enzim. A multiplex PCR során a következő körülményeket biztosítottuk: 95°C-on 5 perc DNS-polimeráz aktiválás, majd 40 kétlépéses ciklus 20 másodperces 94°C-on való

denaturálásból, valamint 60°C-os 1 perces anellálásból és lánchosszabbításból, végezetül 7 perces 72°C-on történő anellálás és extenzió következett.

A pozitív kontrollként szolgáló ACTB gén nested PCR keretében történő amplifikációja a multiplex RT-PCR termék felhasználásával, különösen csben, hasonló reakcióelegy és körülmények alkalmazásával történt.

5.6. Lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis

A PCR-termékek hosszúságát lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis segítségével állapítottuk meg. A frissen fagyasztott minta esetén 0,3 µl, paraffinba ágyazott minta esetén 0,6 µl PCR-végtermékhez 11 µl Hi-Di formamidot és 0,5 µl GeneScan 600 LIZ méretstandardot (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kevertünk. A nukleinsav-oldatot 3 percig 95 °C-on denaturáltuk, majd rögtön jég közé tettük, és ezt követően ABI PRISM™ 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készülékben, POP-4 gélen, a felhasználási útmutatónak megfelelően fluoreszcens kapilláris elektroforézisnek vetettük alá. A *GeneScan analysis software 3.7.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) program tette lehetővé a PCR-termékek fluoreszcens festékekkel jelölt primereken alapuló detektálást. A GeneScan program a különböző festékeket különböző színekkel kódolta, így a 6Fam festékekkel jelölt E7.2 primer termékei kék, a VIC festékekkel jelölt E8.2 primeré zöld, a NED festékekkel jelölt E9.2 primeré fekete, végül a PET festékekkel jelölt E10.2 primer termékei piros színű csúcsként jelentek meg az elektroferogramon. Az elektroferogramról ennek megfelelően leolvasható, hogy a PCR-fragmenst melyik forward primer amplifikálta, valamint az adott termék hossza is. Ezek ismeretében az EWS B-FLI1 B valamint EWS B-ERG primerek segítségével amplifikált lehetséges ampliconok hosszát tartalmazó táblázatról (lásd 3. és 4. táblázat) leolvasható volt az azonosított fúziós transzkriptum típusa. A vizsgálat során, bizonyos esetekben a multiplex PCR-termékeket 2%-os agaróz történő elszedésnek vetettük alá.

3. Táblázat Várható PCR-termékhosszak EWSR1-FLI1 transzlokációt mutató minták EWS B és FLI B primerkészletekkel való amplifikálását követően. Az egyes sorokban színek kódok mutatják, hogy a megfelelő kiméra transzkriptumhoz mely hossz tartozik.

Transzlokáció	Várható amplicon hosszak az amplifikáló primerpárok függvényében			
	E7.2-F4.2	E7.2-F5.2	E7.2-F7.2	E7.2-F9.2
EWS(ex7/8/9/10)-FLI(ex4)	132/313/351/384	288/469/507/540	413/594/632/665	521/702/740/773
EWS(ex7/8/9/10)-FLI(ex5)		84/265/303/336	209/390/428/461	317/498/536/569
EWS(ex7/8/9/10)-FLI(ex6)			143/324/362/395	251/432/470/503
EWS(ex7/8/9/10)-FLI(ex7)			77/258/296/329	185/366/404/437
EWS(ex7/8/9/10)-FLI(ex8)				125/306/344/377
EWS(ex7/8/9/10)-FLI(ex9)				73/254/292/325
	E8.2-F4.2	E8.2-F5.2	E7.2-F7.2	E7.2-F9.2
EWS(ex 8/9/10)-FLI(ex 4)	143/181/214	299/337/370	424/462/495	532/570/603
EWS(ex 8/9/10)-FLI(ex 5)		95/133/166	220/258/291	328/366/399
EWS(ex 8/9/10)-FLI(ex 6)			154/192/225	262/300/333
EWS(ex 8/9/10)-FLI(ex 7)			88/126/159	196/234/267
EWS(ex 8/9/10)-FLI(ex 8)				136/174/207
EWS(ex 8/9/10)-FLI(ex 9)				84/122/155
	E9.2-F4.2	E9.2-F5.2	E9.2-F7.2	E9.2-F9.2
EWS(ex 9/10)-FLI(ex 4)	118/151	274/307	399/432	507/540
EWS(ex 9/10)-FLI(ex 5)		70/103	195/228	303/336
EWS(ex 9/10)-FLI(ex 6)			129/162	237/270
EWS(ex 9/10)-FLI(ex 7)			63/96	171/204
EWS(ex 9/10)-FLI(ex 8)				111/144
EWS(ex 9/10)-FLI(ex 9)				59/92
	E10.2-F4.2	E10.2-F5.2	E10.2-F7.2	E10.2-F9.2
EWS(ex 10)-FLI(ex 4)	123	279	404	512
EWS(ex 10)-FLI(ex 5)		75	200	308
EWS(ex 10)-FLI(ex 6)			134	242
EWS(ex 10)-FLI(ex 7)			68	176
EWS(ex 10)-FLI(ex 8)				116
EWS(ex 10)-FLI(ex 9)				64

4. Táblázat Várható PCR-termékhosszak EWSR1-ERG transzlokációt mutató minták EWS B és ERG primerkészletekkel való amplifikálását követően. Az egyes sorokban színek mutatják, hogy a megfelelő fúziós transzkriptumhoz mely hossz tartozik.

Transzlokáció	Amplifikáló primerpár	
	E7.2-ERG7	E7.2-ERG9
EWS(ex 7/8/9/10)-Erg(ex 6)	129/310/348/381	243/424/462/495
EWS(ex 7/8/9/10)-Erg(ex 7)	57/238/276/309	171/352/390/423
EWS(ex 7/8/9/10)-Erg(ex 8)		114/295/333/366
EWS(ex 7/8/9/10)-Erg(ex 9)		66/247/285/318
	E8.2-ERG7	E8.2-ERG9
EWS(ex 8/9/10)-Erg(ex 6)	140/178/211	254/292/325
EWS(ex 8/9/10)-Erg(ex 7)	68/106/139	182/220/253
EWS(ex 8/9/10)-Erg(ex 8)		125/163/196
EWS(ex 8/9/10)-Erg(ex 9)		77/115/148
	E9.2-ERG7	E9.2-ERG9
EWS(ex 9/10)-Erg(ex 6)	115/148	229/262
EWS(ex 9/10)-Erg(ex 7)	43/76	157/190
EWS(ex 9/10)-Erg(ex 8)		100/133
EWS(ex 9/10)-Erg(ex 9)		52/85
	E10.2-ERG7	E10.2-ERG9
EWS(ex 10)-Erg(ex 6)	120	234
EWS(ex 10)-Erg(ex 7)	48	162
EWS(ex 10)-Erg(ex 8)		105
EWS(ex 10)-Erg(ex 9)		57

5.7. Szekvenálás

A fluoreszcens kapilláris elektroforézis által azonosított PCR-fragmentumok szekvenciáját minden esetben ellenőriztük az ABI PRISM™ 310 Genetic analyzer készüléken való DNS-szekvenálással.

Szekvenáláshoz az RT-PCR-terméket a frissen fagyasztott paraffinba ágyazott mintáknak megfelelő nested PCR reakcióösszetétel és körülmények szerint

amplifikáltuk. A nested PCR összeállítása során csak egy, a lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis segítségével meghatározott kiméra transzkriptumnak megfelelő primerpárt használtunk fel. A nested PCR-terméket a MicroCon Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, USA) szűrővel tisztítottuk, majd a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával, a használati útmutatónak megfelelően szekvenáló PCR-t végeztünk. A PCR program kezdeti deanturációt (1 perc 96°C-on) követően, 36 cikluson keresztül történő amplifikálásból (10 másodperc 96 °C, 5 másodperc 50 °C, 4 perc 60 °C) állt. A szekvenálási PCR-terméket etanolos tisztítás után 16 µl Hi-Di formamidban oldottuk fel, és 95°C-on 3 percig tartó denaturálást követően az ABI Prism 310 Genetikai Analizátor (Applied Biosystems, Foster City, CA) automata kapilláris szekvenáló készülék segítségével azonosítottuk a fúziós transzkriptumok nukleotid sorrendjét.

5.8. Kontroll

Az RNS-minták pozitív kontrolljaként, az RNS minőségének ellenőrzése céljából, a multiplex RT-PCR reakció keretében, a β-aktin génre specifikus külső ACTB A primerpárral minden paraffinba ágyazott mintából származó RNS-en elvégeztük az átírást és amplifikálást. A nested PCR már különösen a paraffinos minták sokszorosításánál leírt PCR-körülmények között, az ACTB B belső primerpár felhasználásával történt. Az amplifikált ACTB-fragmens kimutatása lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézissel és/vagy agaróz gélen való futtatással történt.

Negatív kontrollként minden egyes RNS-izolálást, RT-PCR és PCR folyamatot vízkontrollon is végrehajtottunk. Amennyiben a negatív kontrollból nukleinsav volt kimutatható kapilláris vagy gélelektroforézissel, úgy kontamináció lehetősége miatt a folyamatot megismételtük.

5.9. A módszer optimalizálása

A fentebb leírt módszert a DSMZ-t 1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig, Germany) megrendelt, SK-ES-1 sejtvonalból származó RNS-minta felhasználásával dolgoztuk ki és optimalizáltuk.

5.10. Az EWSR1 gén transzkripció mintázatának vizsgálata

Az E7.1 forward, és az EWSR1 gén 11. exonjára tervezett reverse primerrel (E11 TGTTGTCAGAGTCTTCATCTGGA) a frissen fagyasztott minták vizsgálatánál leírt kondíciókkal RT-PCR reakciót végeztünk. Az RT-PCR terméket nested PCR reakció során az E7.2-E11 primerpárral amplifikáltuk, majd a PCR-terméket lézerindukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis és agaróz gélelektroforézis módszerekkel egyaránt futtattuk. Szekvencia-analízisre e vizsgálat kapcsán nem került sor.

6. Eredmények

6.1. Frissen fagyasztott EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálata

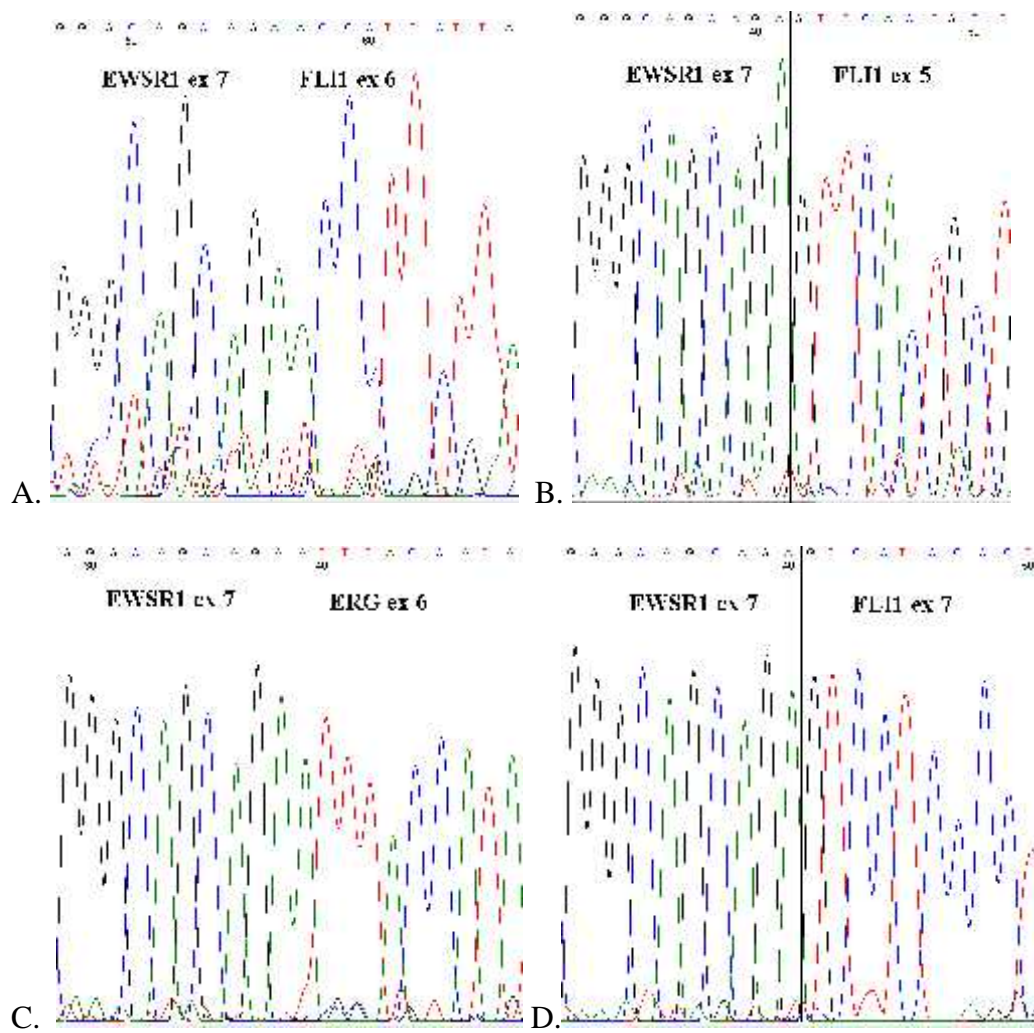
A 22 EFT-beteg 23 frissen fagyasztott mintája közül molekuláris genetikai módszerrel 20 beteg 21 mintájában összesen 9 különböző EWSR1-FLI1 és egyféle EWSR1-ERG fúziós transzkriptumot sikerült azonosítanunk. A vizsgálatba bevont betegek mintáinak molekuláris genetikai eredményei az 5. táblázatban láthatók.

Az EWSR1-FLI1 1. típusaként ismert, leggyakoribb EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) (10A ábra) transzkriptum 10 beteg 11 mintájában fordult el, a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) (10B ábra) valamint az EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6) (10C. ábra) transzkriptumokat pedig 4-4 mintában sikerült kimutatnunk. További egy-egy mintában az alábbi hétféle fúziós transzkriptumot azonosítottuk: EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) (10D. ábra), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8) (11A. ábra), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) (11B. ábra), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6) (11C. ábra), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) (11D. ábra), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) (11E. ábra), EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6) (11F. ábra). Egy esetben a 2. típusú transzlokáció alternatív splicing eredményezte alternatív transzkriptumát (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5^8)) (12. ábra) mutattuk ki, mely nem tartalmazta a 6. és 7. exonokat.

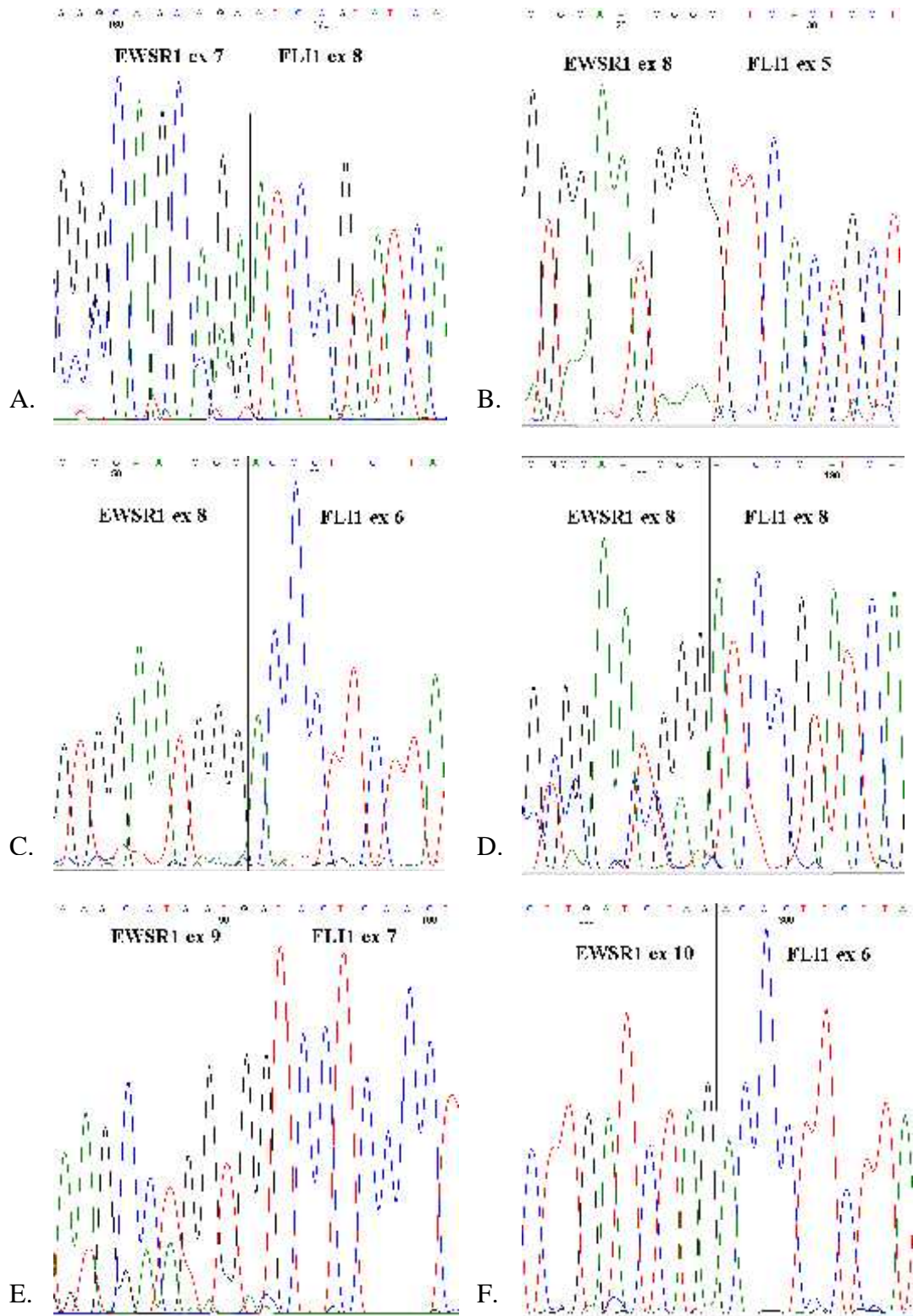
5. Táblázat A vizsgálatba bevont frissen fagyasztott EFT-minták hisztopatológiai adatai és a molekuláris genetikai vizsgálat eredménye (FFT- frissen fagyasztott minta; ES- Ewing-sarcoma; SRCT- kis kereksejtes tumor; pPNET- perifériás primitív neuroectodermális tumor)

Beteg sorszáma	Minta sorszáma	Minta jellege	Hisztológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum
1.	1.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)</i>
2.	2.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i> <i>EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6)</i> <i>EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8)</i>
3.	3.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i>
4.	4.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i> <i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8)</i>

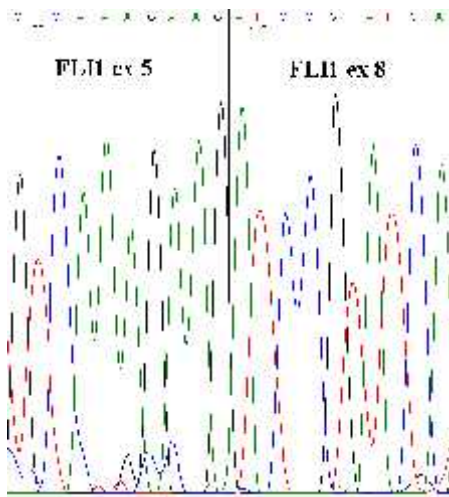
Beteg sorszám	Minta sorszám	Minta jellege	Hisztológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum
5.	5.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
6.	6.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>
7.	7.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i> <i>EWSR1(ex 8)-FLII(ex 5)</i>
8.	8.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
9.	9.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
10.	10.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i>
11.	11.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
12.	12.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>
13.	13.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
	14.	FFT		<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
14.	15.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 10)-FLII(ex 6)</i>
15.	16.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
16.	17.	FFT	ES	—
17.	18.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>
18.	19.	FFT	SRCT, ES/pPNET?	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>
19.	20.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 7)</i> <i>EWSR1(ex 9)-FLII(ex 7)</i>
20.	21.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i> <i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5^8)</i>
21.	22.	FFT	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>
22.	23.	FFT	pPNET	—



10. ábra A frissen fagyasztott mintákban azonosított fúziós transzkriptumok töréspontjának szekvencia részlete I. (A) EWSR1 (ex 7)-FLI1(ex 6); (B) EWSR1 (ex 7)-FLI1(ex 5); (C) EWSR1 (ex 7)-ERG(ex 6); (D) EWSR1 (ex 7)-FLI1(ex 6)



11. ábra A frissen fagyasztott mintákban azonosított fúziós transzkriptumok töréspontjának szekvencia részlete II. (A) EWSR1 (ex 7)-FLI1(ex 8); (B) EWSR1 (ex 8)-FLI1(ex 5); (C) EWSR1 (ex 8)-FLI1(ex 6); (D) EWSR1 (ex 8)-FLI1(ex 7); (E) EWSR1 (ex 8)-FLI1(ex 8); (F) EWSR1 (ex 9)-FLI1(ex 7)

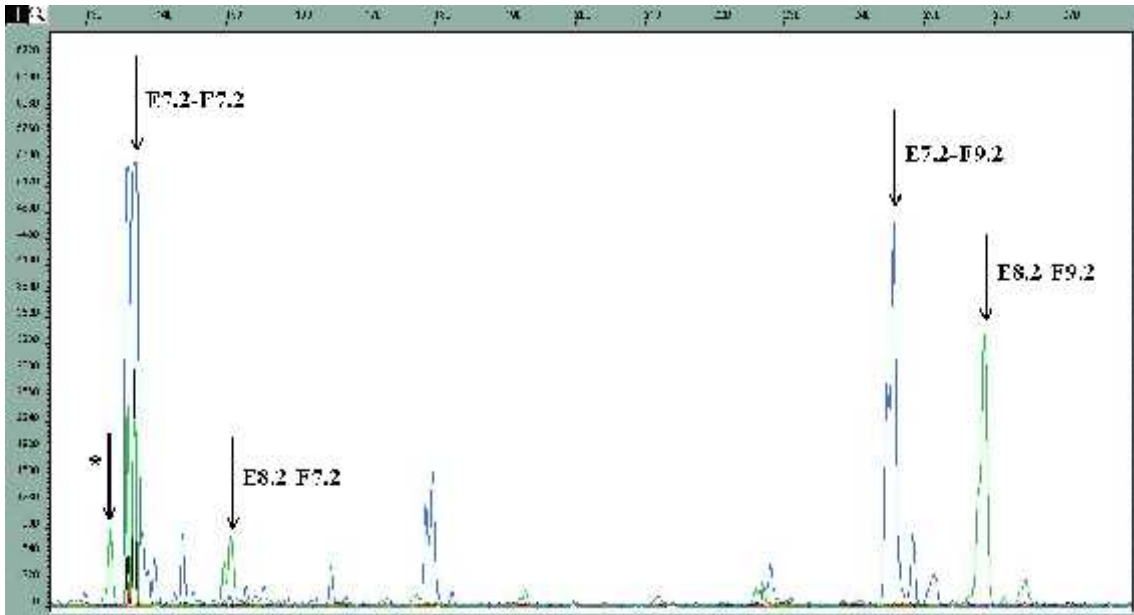


12. ábra A frissen fagyasztott minták vizsgálata során azonosított alternatív transzkriptum, az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5⁸) szekvencia részlete

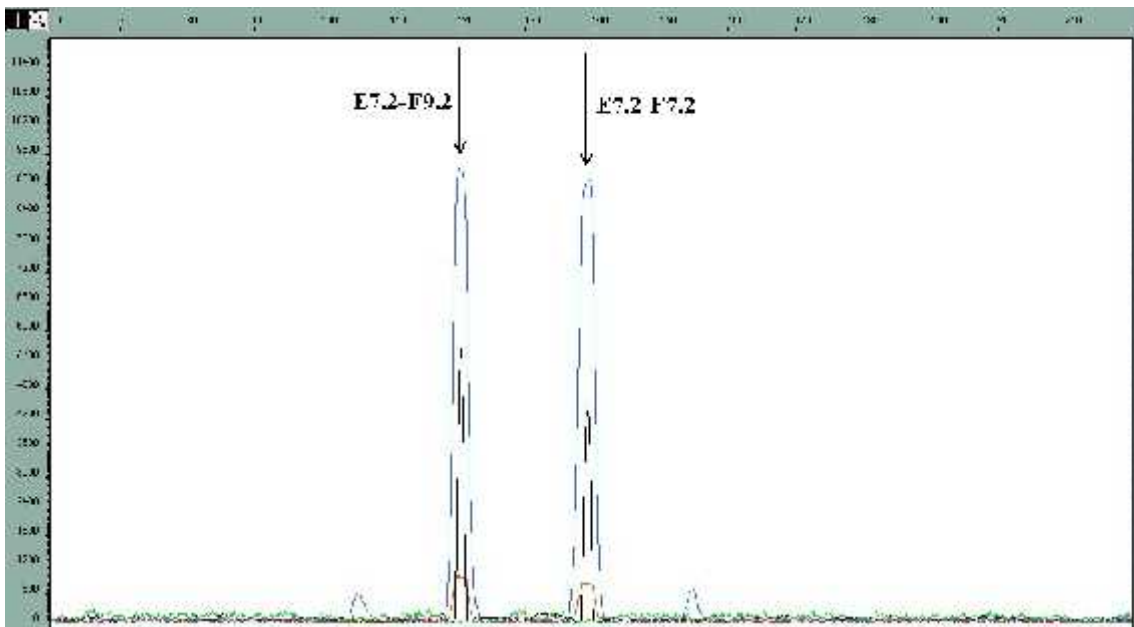
A 21 frissen fagyasztott minta közül, melyekben molekuláris genetikai módszerekkel is igazoltuk fúziós transzkriptumok jelenlétét, 5 mintában többféle fúziós transzkriptumot is találtunk. Egy mintában három, három további mintában pedig két-két különböző kiméra transzkriptumot azonosítottunk. A 2. számú beteg frissen fagyasztott mintájában az alábbi háromféle kiméra transzkriptumot mutattuk ki: EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6) és EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) (13. ábra). A 4. beteg frissen fagyasztott mintájában az EWSR1-FLI1 1. típusa mellett az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8)

transzkriptumot is azonosítottuk (14. ábra). A 7. beteg frissen fagyasztott mintájában két különböző transzkriptumot (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5)) mutattunk ki (15. ábra). A 19-es számú beteg frissen fagyasztott mintájában két fúziós transzkriptumot (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7)) találtunk (16. ábra). Végül a 20-as számú beteg frissen fagyasztott mintájában a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptum mellett annak egy alternatív transzkriptumát (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5⁸)) is azonosítottuk (17. ábra).

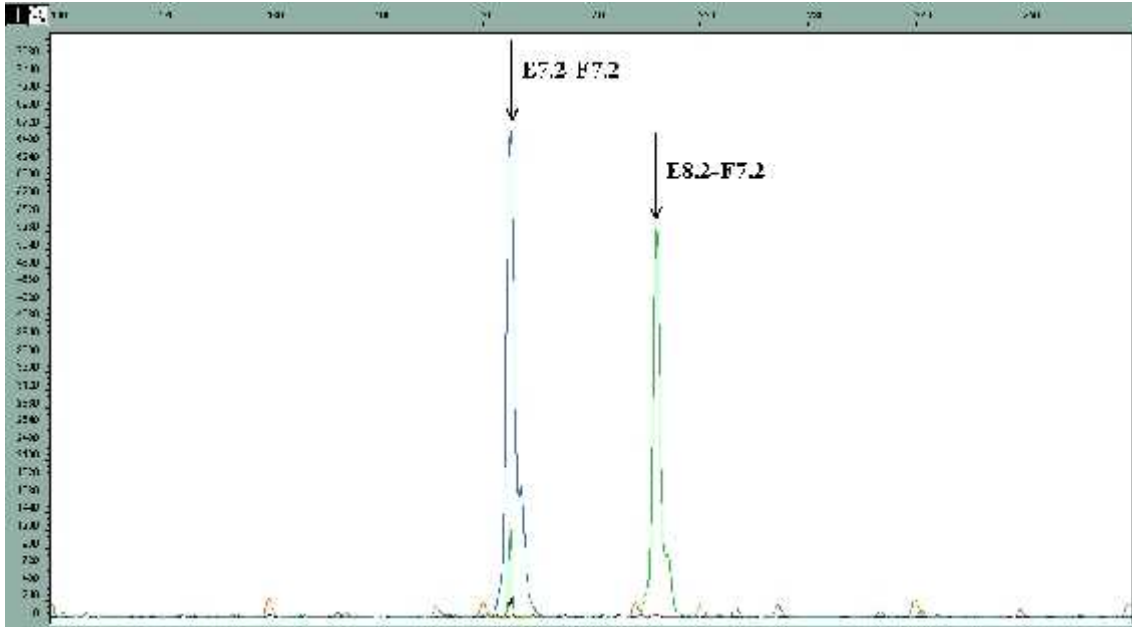
A módszer optimalizálása során, még a betegminták vizsgálatának megkezdése előtt az SK-ES-1 sejtvonal egyik kész passzázsából származó RNS vizsgálata is többféle EWSR1-FLI1 fúziós transzkriptumot mutatott ki. Az eddig leírt EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptum mellett ebben a sejtvonal-passzázsban az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) transzkriptum is megjelent. A korai 2. passzázsából azonban az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) nem volt kimutatható.



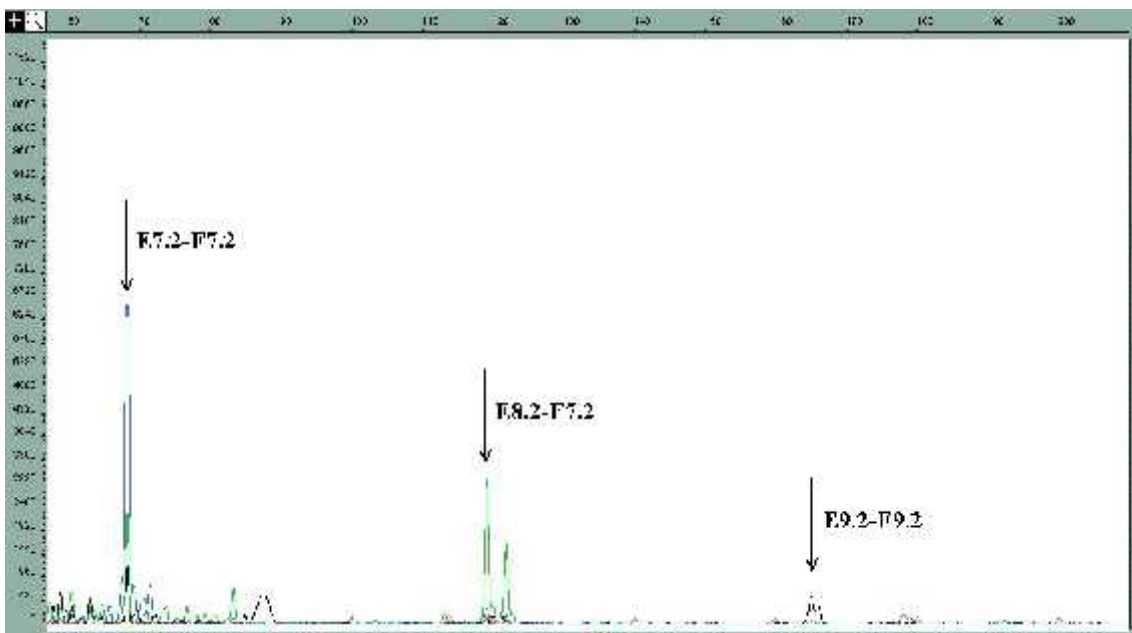
13. ábra A 2. számú beteg FFP-mintájának vizsgálati eredménye elektroferogramon. A mintában három transzkriptumot sikerült azonosítani: az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) transzkriptumot az E7.2-F7.2 és az E7.2-F9.2 primerpárok 143 és 251 bp hosszú ampikon formájában amplifikálták; az E8.2-F7.2 és E8.2-F9.2 primerpárok által 154 és 262 bp hosszúságban sokszorosított EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6) fúziós transzkriptumot, valamint a csillaggal jelölt EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) szekvenciát, melyet az E8.2-F9.2 primerek amplifikáltak 136 bp hosszú termék formájában. (Az elektroferogramon minden fluoreszcens festékkel jelzett primer terméke különböző színű csúcsként ábrázolódik: az E7.2 primer termékei kékek, az E8.2 termékei zöldek, az E9.2 termékei fekete, az E10.2 termékek piros színnel jelennek meg.)



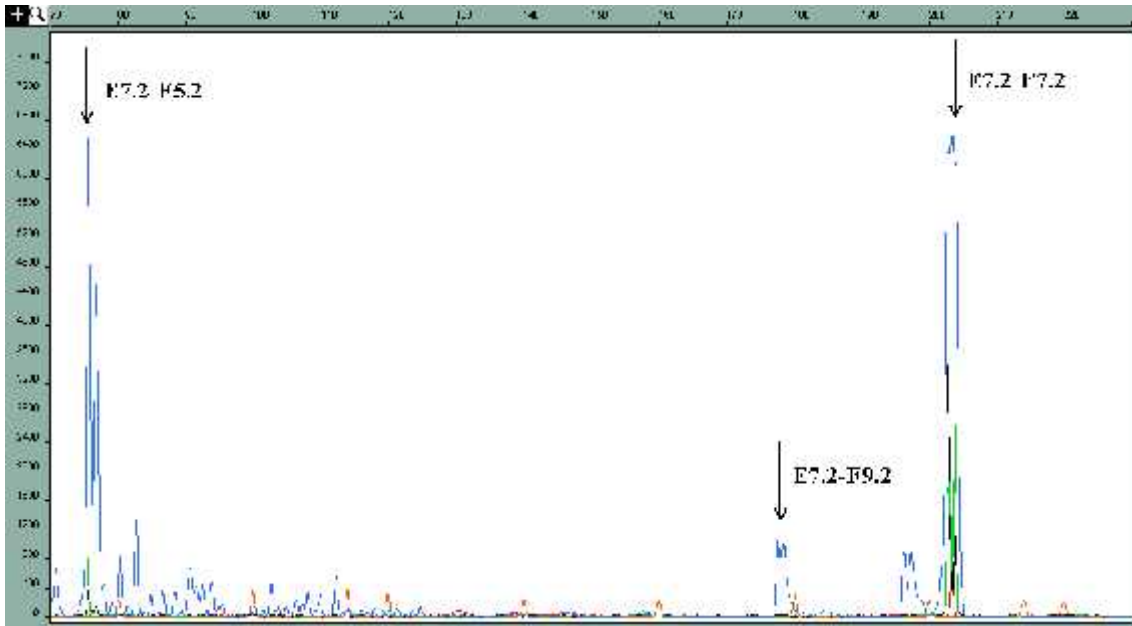
14. ábra A 4. számú beteg FFT-mintájának vizsgálati eredménye. Az elektroferogramon az E7.2-F9.2 primerek által sokszorosított 125 bp hosszú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8) transzkriptum és az E7.2-F7.2 által amplifikált 143 bp-nyi EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) szekvencia ábrázolódott.



15. ábra A 7. számú beteg FFT-mintájának vizsgálati eredménye elektroferogramon. A beteg mintájának analízise során két PCR-terméket lehetett megkülönböztetni: a 209 bp hosszú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptumot, mely az E7.2-F7.2 primerpár segítségével amplifikálódott, valamint az E8.2-F7.2 primerek által sokszorosított 220 bp méretű EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) szekvenciájú terméket.



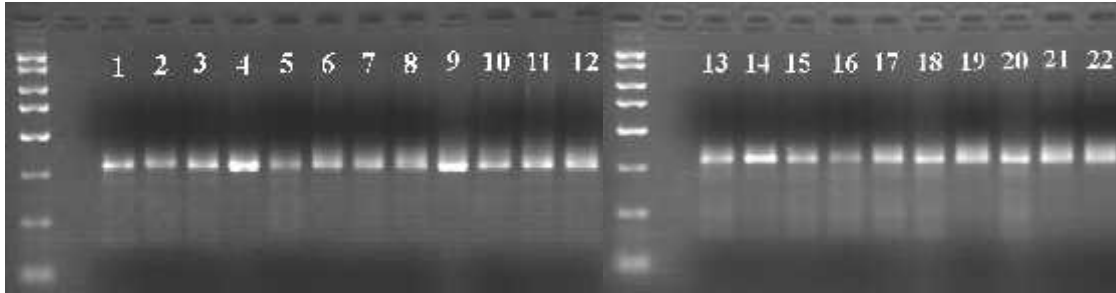
16. ábra A 19. számú beteg frissen fagyasztott mintájának elektroferogramon ábrázolt vizsgálati eredménye. Az elektroferogramon két kiméra transzkriptum jelenik meg három csúcs formájában, az E7.2-F7.2 által amplifikált 77 bp-nyi EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) transzkriptum és az EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7), melyet az E8.2-F7.2, valamint az E9.2-F9.2 primerpárok is sokszorosítottak 126 és 171 bp hosszú termék formájában.



17. ábra A 20. beteg mintájának molekuláris genetikai vizsgálata során készült elektroferogram.

A mintában kimutatott EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptumot 84 és 209 bp hosszú ampliconként az E7.2-F5.2 és az E7.2-F7.2 primerpárok, a 191 bp méretű EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5⁸) alternatív transzkriptumot az E7.2-F9.2 primerek amplifikálták.

Többféle fúziós transzkriptum azonos mintában való kimutatása kapcsán felmerült az igény a transzlokáció által nem érintett, másik allélon elhelyezkedő EWSR1 gén transzkripció mintázatának azonosítására. A 7. és 11. exonok közötti 323 bázispárnyi EWSR1 génrészlet RT-PCR és nested PCR által történt amplifikálása E7.1 és E11 (5'-TTTAAGCAGTGTGGGGTTGT-3'), majd E7.2 és E11 primerpárokkal, továbbá kapilláris és gélelektroforézissel történő megjelenítése során mindegyik frissen fagyasztott mintában csak egyféle, a 7., 8., 9. 10. és 11. exonokat egyaránt tartalmazó transzkriptumnak megfelelő hosszúságú termék ábrázolódott (18. ábra), alternatív transzkriptumokat nem sikerült kimutatni.

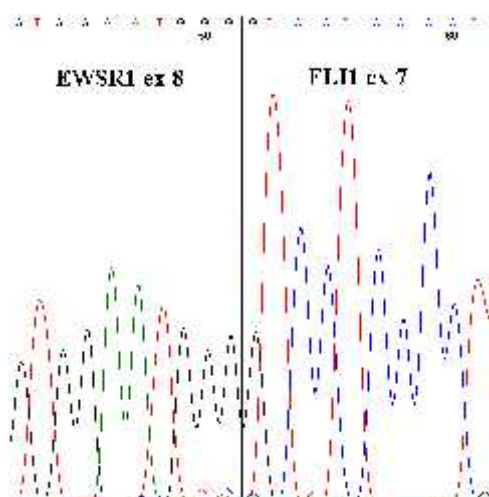


18. ábra Agaróz gélelektroforézissel ábrázolt, a 7-11 exonokat áthidaló, 323 bp-nyi EWSR1 transzkriptum futtatási képe a 22 EFT-beteg frissen fagyasztott mintájában. Mindegyik minta vizsgálata során csak egyféle EWSR1 transzkriptumot sikerült amplifikálni, alternatív transzkriptumok nem ábrázolódtak. A futtatási képen látható számok a megfelelő sorszámú beteg mintáját jelölik.

6.2. Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálata

A vizsgált 47 beteg 60 formalinnal fixált paraffinba ágyazott mintája közül 13 mintában az izolált RNS nem felelt meg a 20 ng/μl minimális koncentrációs követelménynek, így ezeken a mintákon molekuláris genetikai vizsgálatot nem végeztünk. Gyenge RNS-minőség miatt csak két mintát kellett kizárnunk a vizsgálatból, mivel a pozitív kontroll során a -aktin génszakasz többszöri ismétlés ellenére sem amplifikálódott. Összesen tehát 39 beteg 45 mintájának lett értékelhető a molekuláris genetikai vizsgálata. Ezen minták hisztopatológiai adatait és molekuláris genetikai vizsgálatának eredményeit a 6. táblázatban tüntettük fel, míg a feldolgozható mintával bíró betegek vizsgálati eredményeit a 7., összesítő táblázat tartalmazza. Hat beteg esetében két formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintán is vizsgáltuk az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumok jelenlétét, ugyanakkor e minták mindegyike más időpontokban történt mintavételekből származott.

A 45 paraffinba ágyazott EFT-minta közül 25 beteg 27 mintájában sikerült azonosítani EWSR1-FLI1 vagy EWSR1-ERG transzlokációt mind fluoreszcens kapilláris elektroforézis által, mind pedig szekvenálással. A 25 betegből 22 betegnél EWSR1-FLI1, 3 betegnél pedig EWSR1-ERG transzlokációt azonosítottunk legalább egy paraffinos mintában. A következő hat különböző EWSR1-FLI1 transzkriptumot az alábbi gyakoriságban azonosítottuk a 22 betegnél: EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) 12 betegnél (20. ábra), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) 6 betegnél (21. ábra), az EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6) (22. ábra) és EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) 2-2 betegnél, az EWSR1(ex 8)-



19. ábra Az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) transzkriptum szekvenciareészlete.

FLI1(ex 7) és EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzkriptumok pedig egy-egy betegnél. Az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) és EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzkriptumok érdekessége, hogy e három kiméra típust ugyanazon beteg mintájában (23. ábra) azonosítottuk, ugyanakkor e kivételt l eltekintve a paraffinos mintákban nem volt példa többszörös fúziós transzkriptum el fordulására. Három beteg paraffinos mintájában pedig az EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6) transzkriptumot (24.

ábra) sikerült kimutatni. A paraffinos mintákban kimutatott hat EWSR1-FLI1 és egy EWSR1-ERG transzlokáció-variáns közül egyedül a 19.beteg mintájában azonosított EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) transzkriptum (19. ábra) szekvenciája bizonyult újdonságnak a frissen fagyasztott minták eredményeivel összehasonlítva. E beteg mintáinak érdekessége még, hogy a frissen fagyasztott mintában két különböz fúziós transzkriptumot azonosítottunk, de az el bb említett transzkriptumot nem sikerült kimutatni.

6. Táblázat Az EFT-betegek formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintáinak hisztopatológiai adatai és a molekuláris genetikai vizsgálat eredménye (FFPE-formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minta, ES-Ewing-sarcoma, SRCT-kis kereksejtes tumor, PNET-perifériás neuroectodermális tumor)

Beteg sorszáma	Minta sorszám	Minta jellege	RNS (ng/μl)	Hisztopatológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum
2.	1.	FFPE	244	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
	2.	FFPE	144		EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
3.	3.	FFPE	274	ES	—
	4.	FFPE	22		—
4.	5.	FFPE	22	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
5.	6.	FFPE	72	ES	—
6.	7.	FFPE	352	ES	EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)

Beteg sorszáma	Minta sorszám	Minta jellege	RNS (ng/μl)	Hisztopatológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum
	8.	FFPE	50		—
7.	9.	FFPE	105	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)
8.	10.	FFPE	320	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
9.	11.	FFPE	325	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
	12.	FFPE	204		EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
11.	13.	FFPE	97	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
12.	14.	FFPE	939	ES	—
13.	15.	FFPE	243	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
14.	16.	FFPE	34	ES	EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6)
15.	17.	FFPE	93	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
17.	18.	FFPE	38	ES	EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)
18.	19.	FFPE	83	SRCT, ES/PNET?	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
19.	20.	FFPE	30	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7)
20.	21.	FFPE	46	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)
21.	22.	FFPE	268	ES	EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)
23.	23.	FFPE	43	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
24.	24.	FFPE	24	ES	—
25.	25.	FFPE	139	ES	—
26.	26.	FFPE	422	SRCT, ES/PNET?	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)
27.	27.	FFPE	144	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)
28.	28.	FFPE	35	SRCT, ES?	—
29.	29.	FFPE	22	SRCT	—
30.	30.	FFPE	114	SRCT	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
	31.	FFPE	66	ES	—

Beteg sorszáma	Minta sorszám	Minta jellege	RNS (ng/μl)	Hisztopatológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum
31.	32.	FFPE	181	SRCT, ES?	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)
32.	33.	FFPE	33	ES	—
33.	34.	FFPE	84	ES	—
34.	35.	FFPE	355	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)
35.	36.	FFPE	105	ES	—
36.	37.	FFPE	32	ES	—
	38.	FFPE	96		—
37.	39.	FFPE	78	ES	—
38.	40.	FFPE	48	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7)
39.	41.	FFPE	114	ES	—
40.	42.	FFPE	21	ES	—
41.	43.	FFPE	81	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)
42.	44.	FFPE	20	ES	EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6)
43.	45.	FFPE	231	ES	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)

7. Táblázat A molekuláris genetikai vizsgálat számára megfelelő min ség mintával bíró 43 EFT-beteg 23 frissen fagyasztott és 45 paraffinba ágyazott, összesen 68 mintájának hisztopatológiai adatai és a molekuláris genetikai vizsgálat eredménye.

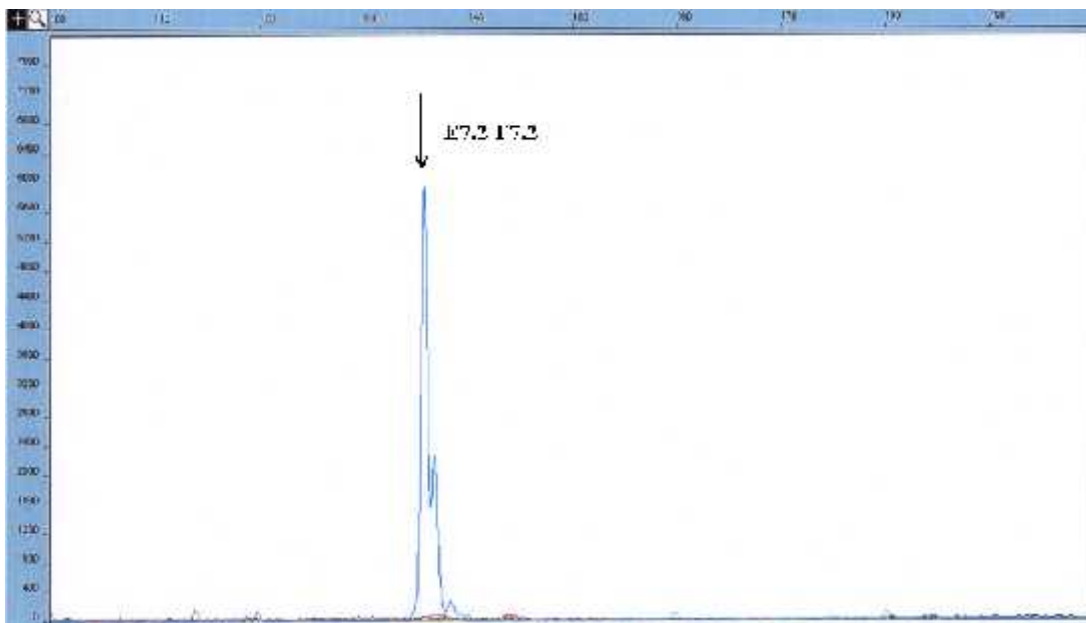
A 23 FFT-minta sorszámát pirossal, a 45 FFPE-minta sorszámát feketével jelöltem. A minták kora a biopsziától ill. tumorrezekciótól a minták feldolgozásáig eltelt id szakot jelöli. (FFT-frissen fagyasztott minta, FFPE-formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minta, ES-Ewing-sarcoma, SRCT-kis kereksejtes tumor, PNET-perifériás neuroectodermális tumor)

Beteg sor-száma	FFT/FFPE minták sorszáma	Minta jellege	Minta kora (év)	Hisztopatológiai diagnózis	RNS (ng/μl)	Kimutatott fúziós transzkriptumok
1.	1.	FFT	10	ES	4812	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
2.	2.	FFT	9	ES	3649	EWS(ex 7)-FLI(ex 6) EWS(ex 8)-FLI(ex 6) EWS(ex 8)-FLI(ex 8)

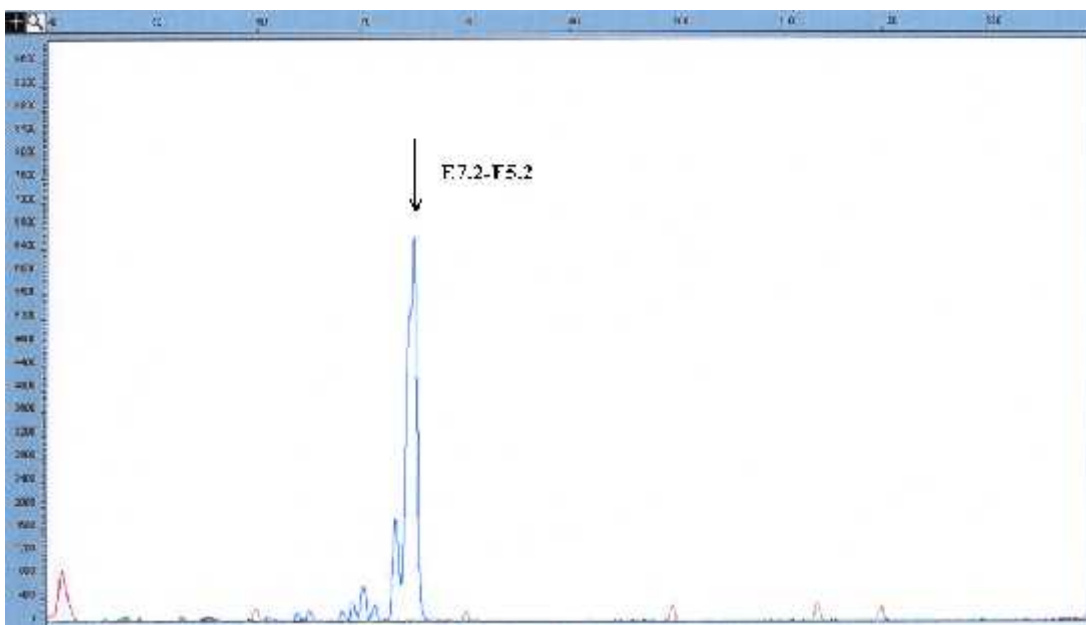
	1.	FFPE	12		244	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	2.	FFPE	11		144	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
3.	3.	FFT	9	ES	2179	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	3.	FFPE	12		274	—
	4.	FFPE	11		22	—
4.	4.	FFT	6	ES	1951	EWS(ex 7)-FLI(ex 8) EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	5.	FFPE	7		22	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
5.	5.	FFT	5	ES	270	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	6.	FFPE	6		72	—
6.	6.	FFT	5	ES	1232	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
	7.	FFPE	8		352	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
	8.	FFPE	7		50	—
7.	7.	FFT	4	ES	723	EWS(ex 7)-FLI(ex 5) EWS(ex 8)-FLI(ex 5)
	9.	FFPE	5		105	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
8.	8.	FFT	4	ES	597	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	10.	FFPE	5		320	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
9.	9.	FFT	4	ES	2662	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	11.	FFPE	8		325	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	12.	FFPE	7		204	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
10.	10.	FFT	4	ES	618	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
11.	11.	FFT	3	ES	1722	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	13.	FFPE	6		97	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
12.	12.	FFT	3	ES	1479	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
	14.	FFPE	6		939	—
13.	13.	FFT	3	ES	578	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	15.	FFPE	4		243	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	14.	FFT	3		1189	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
14.	15.	FFT	3	ES	820	EWS(ex 10)-FLI(ex 6)
	16.	FFPE	6		34	EWS(ex 10)-FLI(ex 6)

Beteg sor-száma	FFT/FFPE minták sorszáma	Minta jellege	Minta kora (év)	Hisztopatológiai diagnózis	RNS (ng/μl)	Kimutatott fúziós transzkriptumok
15.	16.	FFT	3	ES	528	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	17.	FFPE	4		93	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
16.	17.	FFT	2	ES	482	—
17.	18.	FFT	2	ES	718	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
	18.	FFPE	3		38	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
18.	19.	FFT	2	SRCT, ES/ pPNET?	1205	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	19.	FFPE	1		83	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
19.	20.	FFT	2	ES	784	EWS(ex 7)-FLI(ex 7) EWS(ex 9)-FLI(ex 7)
	20.	FFPE	5		30	EWS(ex 7)-FLI(ex 7) EWS(ex 8)-FLI(ex 7) EWS(ex 9)-FLI(ex 7)
20.	21.	FFT	1	ES	462	EWS(ex 7)-FLI(ex 5) EWS(ex 7)-FLI(ex 5^8)
	21.	FFPE	2		46	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
21.	22.	FFT	0	ES	828	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
	22.	FFPE	1		268	EWS(ex 7)-ERG(ex 6)
22.	23.	FFT	0	pPNET	194	—
23.	23.	FFPE	2	ES	43	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
24.	24.	FFPE	2	ES	24	—
25.	25.	FFPE	3	ES	139	—
26.	26.	FFPE	4	SRCT, EFT	422	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
27.	27.	FFPE	4	ES	144	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
28.	28.	FFPE	4	SRCT, ES?	35	—
29.	29.	FFPE	5	SRCT	22	—

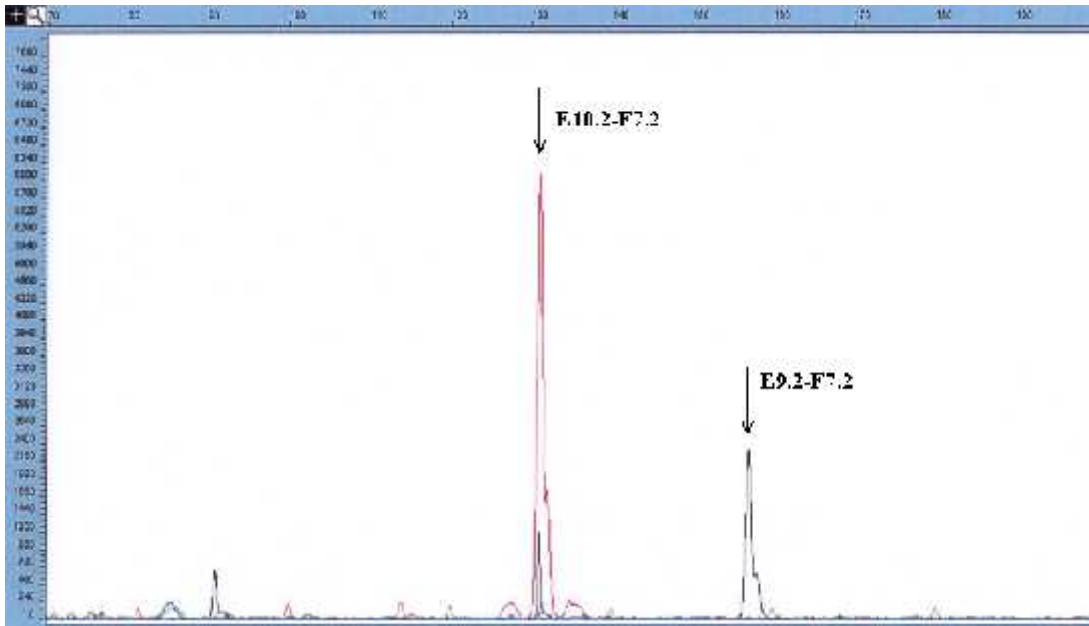
Beteg sor-száma	FFT/FFPE minták sorszáma	Minta jellege	Minta kora (év)	Hisztopatológiai diagnózis	RNS (ng/μl)	Kimutatott fúziós transzkriptumok
30.	30.	FFPE	6	SRCT	114	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
	31.	FFPE	7	ES	66	—
31.	32.	FFPE	6	SRCT, ES?	181	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
32.	33.	FFPE	6	ES	33	—
33.	34.	FFPE	7	ES	84	—
34.	35.	FFPE	7	ES	355	EWS(ex 7)-FLI(ex 5)
35.	36.	FFPE	9	ES	105	—
36.	37.	FFPE	9	ES	32	—
	38.	FFPE	10	ES	96	—
37.	39.	FFPE	10	ES	78	—
38.	40.	FFPE	10	ES	48	EWS(ex 7)-FLI(ex 7)
39.	41.	FFPE	10	ES	114	—
40.	42.	FFPE	11	ES	21	—
41.	43.	FFPE	11	ES	81	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)
42.	44.	FFPE	11	ES	20	EWS(ex 10)-FLI(ex 6)
43.	45.	FFPE	11	ES	231	EWS(ex 7)-FLI(ex 6)



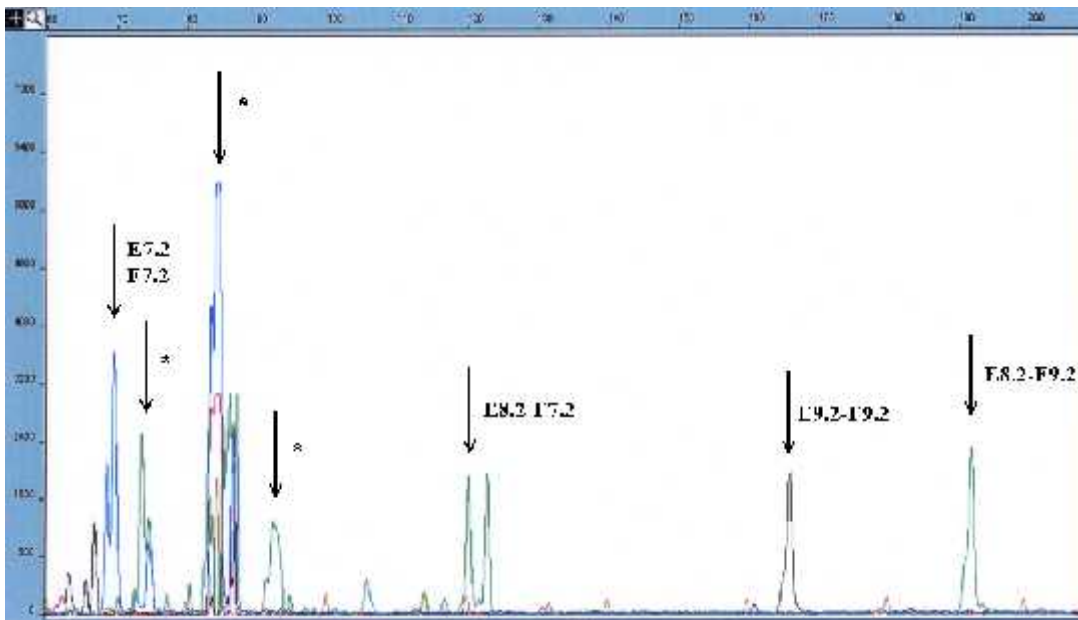
20. ábra Az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) kiméra transzkriptum elektroferogramja, melyen az E7.2-F7.2 primerpárok által amplifikált 143 bp hosszú fragmens csúcsa ábrázolódik



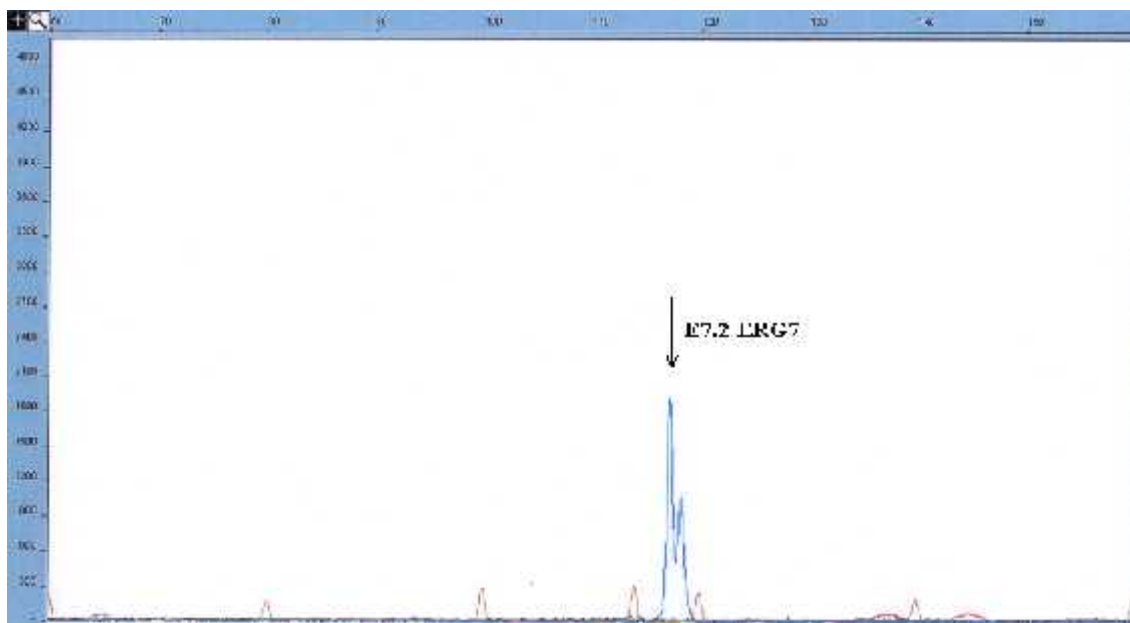
21. ábra Az E7.2-F5.2 primerek által amplifikált 84 bp-nyi EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptum kapilláris elektroforézisének eredménye



22. ábra Az EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6) transzkriptumot tartalmazó minta molekuláris genetikai vizsgálatának eredménye. Ezen az elektroferogramon a frissen fagyasztott minták elektroferogramjához hasonlóan több csúcs is ábrázolódik, melyek az E10.2-F7.2 és az E9.2-F7.2 primerpárok által amplifikált 134 és 162 bp hosszú PCR-termékek.



23. ábra A 20. számú paraffinos mintában kimutatott EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) és EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzkriptumok elektroferogramja. A nyilak a következő termékeket jelölik: az E7.2-F7.2 által amplifikált 77 bp EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) és az E8.2-F9.2 által sokszorosított 196 bp EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) fragmentumok, valamint az EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzkriptumot amplifikáló E8.2-F7.2 és E9.2-F7.2 primerek 126 és 171 bp-nyi PCR-termékei.



24. ábra Az EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6) transzkriptumról az E7.2-ERG7 primerpárok által sokszorosított 129 bp hosszú termék elektroferogramja

7. Megbeszélés

7.1. Az EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálata

7.1.1. Az EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálati eredményeinek megbeszélése

Kutatásom elsődleges célja az EFT-diagnosztika kidolgozása volt, mely módszer teszteléséhez megfelelő eset- és mintaszámra volt szükségem. Tekintettel azonban a Ewing-családba tartozó tumorok igen alacsony előfordulási gyakoriságára, egy betegről több mintát is fel kellett használnom a vizsgálataimhoz. A minták kiválasztásánál vezérelő volt, hogy mind a frissen fagyasztott, mind a paraffinos mintákon belül egy mintavételből (biopszia vagy kimetszés) csak egy mintát vizsgáljak, ugyanakkor a különböző időpontban történt mintavételekből származó mintákat beemleltem a vizsgálataimba. A frissen fagyasztott és a paraffinos minták között azonban van azonos mintavételből származó átfedés, ugyanis mindkét mintacsoport esetében módosított diagnosztikus metodikát használtam. Az összes, vizsgálatba bevont beteg közül 25 betegnek, a molekuláris genetikai vizsgálatra alkalmasnak talált mintájú betegek közül pedig 20 betegnek van ilyen módon többes mintája.

A monoplex vagy multiplex RT-PCR-t követően multiplex PCR és lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis módszerével, valamint DNS-szekvenálással történő megerősítés által 22, illetve 39, többségében EFT-ként diagnosztizált tumoros beteg 23 frissen fagyasztott, illetve 45 paraffinba ágyazott mintáját dolgoztuk fel.

Huszonkét beteg 23 frissen fagyasztott mintájából 21 (91%) mintában, míg 39 beteg 45 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintájából 27 (60%) mintában sikerült a leírt módon EWSR1-FLI1 vagy EWSR1-ERG transzlokációt igazolni. Az átfedések miatt a 43, molekuláris genetikai vizsgálatnak alávetett mintájú betegből 30 beteg (70%) esetében tudtam így molekuláris genetikai módszerrel is megerősíteni a klinikai és immun-hisztokémiai alapokon álló diagnózist.

A harminc, transzlokáció-pozitív betegben összesen 10 különböző EWSR1-FLI1 és egy EWSR1-ERG fúziós transzkriptumot találtunk. Ezek közül a két leggyakoribb, 1. és 2. típusúnak nevezett EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) illetve EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzlokációs transzkriptumot 14 (47%), valamint 8 (27%) betegnél azonosítottuk, ami,

tekintettel a magyar viszonylatban nagynak számító, nemzetközileg közepes számú betegcsoportunkra, nem tér el jelentősen a világviszonylatban megállapított gyakoriságoktól. Van Doorninck 132 minta vizsgálatát felölelő tanulmányában (Van Doorninck és mtsai 2010) 59% és 16% az 1. és 2. típus előfordulási gyakorisága. Le Deley által publikált tanulmányban (Le Deley és mtsai 2010) a két leggyakoribb transzlokáció típus előfordulási gyakorisága munkacsoporttól függően, 58, 193, ill. 314 beteg adatait alapul véve 48-59% ill. 20-28% között mozgott, míg az összes beteg adatait nézve 52% és 24% volt. Az EWSR1-ERG transzlokáció előfordulása 13%-os volt a mi vizsgálatunkban (4 beteg a 30 betegből), mely gyakoriság szintén közel megegyezik van Doorninck és munkatársai 10%-os eredményével.

A leggyakoribb EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) és EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptumokon kívül négy betegnél azonosítottunk EWSR1(ex 7)-ERG (ex 6) (13%), valamint két-két további betegnél EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) (6,5%) vagy EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6) (6,5%) fúziós transzkriptumokat. Hat betegnél pedig egyedi, a mi vizsgálatunk során csak ezen betegek mintájára jellemző transzlokációs transzkriptumokat sikerült azonosítani, úgymint a EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzlokációkat (3-3%), valamint a 2. típusú transzlokáció már említett alternatív transzkriptumát (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5⁸)), mely nem tartalmazza a 6. és 7. exonokat. Ezen egyedi kimérek transzkriptumok közül kettőt, az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) és EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) transzkriptumokat legjobb tudomásunk szerint mi közöltük először.

A 43 vizsgált EFT-beteg közül azonban 13 beteg (30%) 2 frissen fagyasztott, ill. 18 paraffinos mintáinak egyikében sem sikerült EWSR1-FLI1, vagy EWSR1-ERG transzlokációt kimutatni a fluoreszcens kapilláris elektroforézis és DNS-szekvenálás módszereivel együttesen.

7.1.2. Az EFT-minták molekuláris genetikai vizsgálati módszerének megbeszélése

Kutatásom során céлом volt olyan, az EWSR1-ETS transzlokáció diagnosztizálására alkalmas módszer kidolgozása, mely képes kimutatni minden lehetséges EWSR-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumot azok töréspont-függ heterogenitása ellenére is. Céлом volt továbbá a módszer optimalizálása formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-minták diagnosztizálására is, mely terület a molekuláris genetikai vizsgálatok alapjául szolgáló RNS degradálódása következtében még több kihívásban b velkedik. A vizsgálati módszer érzékenységének növelése érdekében ötvöztem a nagy kópiaszám el állítására képes nested PCR technikát a hagyományos gélelektroforézisnél érzékenyebb lézer indukálta fluoreszcens kapilláris elektroforézis módszerével. A paraffinos mintákban tapasztalt RNS-töredezetségi miatt az EWSR1, FLI1 és ERG génekre több primerből álló primerkészletet terveztem, hogy a lehetséges töréspontok ismeretében az összes lehetséges fúziós transzkriptumot legfeljebb 150 bp-nyi ampliconok formájában sokszorosítani tudjam. Az RNS, a reagensek, valamint időmegtakarítása céljából kis térfogatú (RT-)PCR-ekkel dolgoztam, melyek körülményeit úgy optimalizáltam, hogy a templátok több primerpár által, egyszerre történ sokszorosítását biztosítsam. A két leggyakoribb transzlokációtípus, az EWSR1-FLI1 és az EWSR1-ERG transzlokációk heterogenitásának figyelembevételével a nested multiplex PCR-reakció forward primereit különböző fluoreszcens festékekkel jelöltettem, melyek egymástól való megkülönböztetésére, valamint az adott forward primer által amplifikált termék hosszának megállapítására a lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis tökéletesen alkalmas. Az amplifikáló forward primer, valamint az amplicon hosszának ismeretében a kimutatott kiméra transzkriptum típusa leolvasható egy általam készített táblázatról. Ez a táblázat tartalmazza az összes lehetséges intronikus töréspontnak megfelelő fúziós transzkriptumról a rendelkezésre álló primerek által sokszorosítható ampliconok várható hosszát.

A módszer SK-ES-1 sejtvonalon történ optimalizálását követően feldolgoztam a rendelkezésre álló, immun-hisztológiai módszerekkel diagnosztizált frissen fagyasztott és paraffinba ágyazott EFT-mintákat.

A frissen fagyasztott minták vizsgálata során EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumokat 91%-ban azonosítottunk. Összehasonlítva más, relatíve nagyszámú,

az EWSR1-FLI1 és az EWSR1-ERG transzlokációk publikált vizsgálatával, melyek diagnosztikus érzékenysége 80-95% között mozog (8. táblázat), a módszer szenzitivitása megfelel az élvonalbeli módszereknek. Ugyanakkor a módszer a magas érzékenységen kívül még olyan elnyökkel is rendelkezik, mint a kis mennyiség (40-60 ng) RNS felhasználása, kis térfogatú PCR (7,5 µl), több, különböző hosszúságú amplicon amplifikációjának lehetősége ugyanarról a fúziós transzkriptumról, mely így akár szekvenálás nélkül is lehetővé teszi a transzkriptum felismerését, valamint a módszer érzékenysége folytán az esetlegesen jelen lévő több kiméra transzkriptum kimutatása.

A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták vizsgálati módszerének érzékenysége kutatásunkban 60%-nak bizonyult. A szakirodalomban fellelhető, hasonlóan csak immun-hisztokémiai diagnózison alapuló, paraffinos EFT-minták molekuláris genetikai diagnosztikájának érzékenysége nagy szórást mutat, 43-83% között mozog (9. táblázat). Ennek megfelelően az itt bemutatott diagnosztikus módszer érzékenysége megfelelő, ugyanakkor célszerűen magasabb érzékenységű módszer kidolgozása volt.

8. Táblázat A molekuláris genetikai vizsgálatok érzékenységének összehasonlító táblázata.

Legalább 20 frissen fagyasztott, immun-hisztokémiai módszerrel diagnosztizált EFT-minta molekuláris genetikai módszerekkel történő diagnosztizálásán alapuló irodalmi közlések összehasonlító táblázata.

Szerzők	EFT fúziós transzkriptumokra pozitív/összes vizsgált minta száma	Érzékenység	Módszer
Delattre és mtsai 1994	83/87	95%	RT-PCR, gélelektroforézis, szekvenálás, Northern és Southern blot
Zoubek és mtsai 1994	28/30	93%	RT-PCR, gélelektroforézis, szekvenálás, Northern blot
Dagher és mtsai 2001	58/72	80%	RT-PCR, szükség esetén nested PCR, gélelektroforézis, szekvenálás, Southern blot
Le Deley és mtsai 2010	521/578	90%	RT-PCR, nested single/multiplex PCR, gélelektroforézis, szekvenálás
van Doorninck és mtsai 2010	119/132	90%	Single qRT-PCR (SYBR green), gélelektroforézis, szekvenálás
Jelen tanulmány	21/23	91%	multiplex RT-PCR, nested fluorescens PCR, lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis

9. Táblázat A molekuláris genetikai vizsgálatok érzékenységének összehasonlító táblázata hisztológiai módszerekkel diagnosztizált, formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-mintákon

Szerzők	EFT fúziós transzkriptumokra pozitív / összes vizsgált minta száma	Érzékenység	Módszer
Hisaoka és mtsai 1999	20/24	83%	RT-PCR, nested PCR
Hill és mtsai 2002	29/41	71%	RT-PCR, gélelektroforézis
Fritsch és mtsai 2003	21/28	72%	RT-PCR, gélelektroforézis
Stegmaier és mtsai 2004	23/31	74%	3 RT-PCR 3 különböző EWSR1-FLI1 primerpárral
Bridge és mtsai 2006	?/43 nem csak EFT	54%	RT-PCR, gélelektroforézis
Lewis és mtsai 2007	43/53	81%	Real-time RT-PCR
Thway és mtsai 2010	6/14	43%	Real-time RT-PCR?
Jelen tanulmány	27/45	60%	multiplex RT-PCR, nested fluorescens PCR

Több magyarázat is lehetséges a hisztopatológiai módszerrel EFT-nek diagnosztizált, molekuláris genetikai módszerekkel azonban negatívnak bizonyuló minták viszonylag nagy számára. Egyrészt a degradált RNS-sel való munka nehézségei megmutatkoznak a DNS-szekvenálásban is. A primerek tervezésekor fontos szempont volt, hogy az ampliconok hossza ne haladja meg a 150-200 bázispárt, mivel degradált RNS esetén kb. ekkora templáttal lehet számolni. Tekintettel arra, hogy csak az EWSR1-FLI1 transzlokáción belül számos variációs lehetőség van a töréspont elhelyezkedésére, valamint nem csak az ampliconok hossza volt maximálva, de a lehetséges ampliconhosszaknak legalább 2-3 bázispárral kellett különbözniük

egymástól, ezért a szekvenálás számára ideális minimum kb. 90-100 bp-nyi amplikonhossz igényt nem lehetett tartani. Továbbá az FLI1 exonok szekvenciája sem volt mindenhol megfelelő primer tervezéséhez, ami szintén sz kítette a lehetséges primerek körét. Az amplikonok várható hossza így az EWSR1-FLI1 transzlokációk esetében 59-154 bp között mozog. Természetesen a 100 bp alatti amplikonokat szekvenálni is nehezebb, ezért fluoreszcens kapilláris elektroforézissel kimutatott rövid amplikon esetén a szekvenálás el tti amplifikációhoz másik, hosszabb amplikont sokszorosító primerpárt választottunk. Az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzlokáció esetén pl. az amplikon várható hossza 84 bp volt, ami fluoreszcens kapilláris elektroforézissel kimutatható volt. Ugyanakkor szekvenáláshoz a transzlokációt az E7.2 és F7.2 primerpárral amplifikáltuk, a termék várható hossza pedig 209 bp volt. Ez utóbbi amplikon viszont a RNS degradációja következtében nehezebben amplifikálódott, így el fordult, hogy a fluoreszcens kapilláris elektroforézissel kimutatott transzlokációt DNS-szekvenálással nem tudtuk igazolni.

A viszonylag rövid EWSR1 (7. exon-10. exon, összesen kb. 350 bp) és FLI1 génszakaszokat (4. exon-9. exon, kb. 500 bp) amplifikáló 4-4, az exonhatárokat tiszteletben tartó, és meghatározott exonokra tervezett primerek igénye lehetetlenné tette olyan tökéletes primerek tervezését, melyek egyáltalán nem mutatnak másodlagos szerkezetek (dimer, hairpin) képz désére hajlandóságot. Továbbá a multiplex PCR természetéb l fakadóan a reakció úgy lett optimalizálva, hogy lehet leg specifikus, de minél több termék képz dese biztosítva legyen. A magas színvonalú PCR-kit használata, a magas anellálási h mérséklet, a két keret primerpár használata mind az aspecifikus termékek képz dését hivatott akadályozni, ennek ellenére lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis módszerrel fként a 100 bp alatti hossztartományban aspecifikus termékek láthatók, melyek nehezítik az ebbe az amplikonhosszba tartozó specifikus PCR-termékek egyértelmű azonosítását. A második leggyakoribb transzkriptum (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)) várható hossza szintén ebbe a tartományba esik, de azonosítása a várható, illetve mért hosszkülönbség ismeretében nem igazán okozott nehézséget a vizsgálatok során. Ennek ellenére a ritka fúziós transzkriptumok azonosítása a 100 bp alatti hossztartományban nehezített volt. Frissen fagyasztott minták esetében ez általában nem okozott gondot, mivel többnyire legalább két primerpár alkalmas ugyanannak a kiméra transzkriptumnak más-más hosszúságban

való sokszorozására, ami ellensúlyozza a rövid ampikonok azonosítási nehézségeit. Paraffinos minták esetében azonban a rövidebb összefüggő RNS-részletek miatt nagyrészt csak egy, a lehetséges legrövidebb ampikont sokszorozító primerpár fogja a fúziós transzkriptumot amplifikálni, így e transzkriptum felismerésének nehézségei növelhetik az álnegatív minták számát.

Figyelembe kell vennünk azt is, hogy csak a két leggyakoribb transzlokációtípusát (EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG) vizsgáltuk, így a ritkábban előforduló EFT-transzlokációkat nem tudtuk kimutatni. A ritkább transzlokációk előfordulása kb. 1-2%, ami a mi esetszámunkat tekintve, nagy valószínűséggel nem jelent 1-2 mintaszámnál többet, mégis hozzájárulhat az álnegatív esetek nagyobb számához.

Nem zárható ki lehetséges okként az a magyarázat sem, hogy a β -aktin housekeeping gén nested amplifikációja nem elég érzékeny az RNS-minőség differenciálására, mivel jelentős koncentrációkülönbség fordulhat elő az EWSR1-FLI1/ERG és a β -aktin gén expressziójában.

Végezetül hangsúlyoznom kell, hogy a vizsgálatba bevont minták diagnosztizálása klinikopatológiai és immun-hisztokémiai alapokon történt, s miután e vizsgálatok specifikussága és szenzitivitása nem 100%-os, ezért minden bizonnyal van a minták között nem a Ewing-családhoz tartozó tumorminta.

A paraffinos minták vizsgálati érzékenységének magyarázata során azonban ki kell térni az érzékenységet kismértékben érintő, de az eredmények értelmezésére kiható jelenségre. A multiplex PCR várható ampikonjainak hossza és az ABI PRISM 310 Genetic analyzer által mért ampikonhosszok között ugyanis pár bázispár hosszkülönbség volt tapasztalható. Az E7.2, E8.2, E9.2 és E10.2 primerek ampikonjai fluoreszcens kapilláris elektroforézis módszerrel mérve 6-7, 4, 5-6 illetve 3 bázispárral rövidebbnek bizonyultak a várható, szekvencia alapján kiszámolt hosszukhoz képest. Az E7.2-F5.2 primerpár terméke azonban ettől eltérően, 9 bázispárnyi relatív rövidülést mutatott a mérések során. Multiplex PCR termékeinek mért, relatív hosszrövidüléseire van példa a szakirodalomban (Deng és mtsai 2000, Kojima és mtsai 2002), és a primer-primer interakciókat (pl. hairpin-képződést) teszik felelőssé a jelenségért. Ugyanakkor ez a megfigyelés nem befolyásolja jelentősen a PCR-termékek azonosítását a leírt módszerrel, ugyanis a termék hosszak változásai elsősorban a forward primerhez kapcsolódnak, és miután a forward primereket különböző fluoreszcenciájuk alapján

azonosítani tudjuk, a hosszváltozások figyelembevétele figyelmet igényel, de nem okoz komoly problémát.

Bár a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-minták vizsgálatára kialakított módszer érzékenységét tekintve nem töltötte be teljes mértékben a hozzá f zött reményeket, ki kell hangsúlyoznom, hogy tudomásom szerint ez az els olyan multiplex PCR-t magába foglaló módszer az EFT diagnosztikájában, mely egy-egy cs ben képes amplifikálni az összes lehetséges EWSR1-FLI1, illetve EWSR1-ERG transzkriptumot. Az el z leg ajánlott módosítások után a bemutatott módszer alkalmassá válhat komoly alternatíva nyújtására az archivált EFT-minták diagnosztikájának terén, tekintettel a módszer kis RNS és reakcióelegy igényére.

7.2. Az egy mintában kimutatott többszörös fúziós transzkriptumok megbeszélése

Vizsgálatomnak az új metodikán túlmutató érdekessége, hogy a 30 beteg közül, akiknél molekuláris genetikai módszerrel is sikerült igazolnunk az EFT diagnózist, 5 beteg mintájában többféle fúziós transzkriptumot is találtunk. A 2. számú beteg frissen fagyasztott mintájában háromféle kiméra transzkriptumot mutattunk ki (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6) és EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8)). Ugyanakkor ugyanez a beteg 11, illetve 12 éves 1. és 2 számú paraffinos mintájában csak a gyakoribb EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) transzkriptum volt azonosítható (5. és 6. táblázat). A 4. beteg frissen fagyasztott mintájában az EWSR1-FLI1 1. típusa mellett EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8) transzlokációt is kimutattunk, az 5. számú paraffinos mintájában viszont csak az 1. típust tudtuk azonosítani. A 7. beteg frissen fagyasztott mintájában két különböző (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5)) kiméra transzkriptumot mutattunk ki, de az 9. számú paraffinos mintában itt is csak egy, a 2. típusú EWSR1-FLI1 transzkriptumot azonosítottuk. Ezzel szemben a 19. számú beteg 20. számú paraffinos mintájában háromféle transzkriptumot mutattunk ki, az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) és EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzkriptumokat, míg a frissen fagyasztott mintában e fúziós transzkriptumokból csak kett t (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7)) találtunk. Végül a 20-as számú beteg frissen fagyasztott mintájában a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)

transzlokáció mellett annak egy alternatív transzkriptumát is azonosítottuk, melyben a 6. és 7. exon kivágódott, de a paraffinos mintában (21. szám) az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5⁸) nem volt azonosítható.

A nested PCR módszer alkalmazása esetén tisztában kell lenni a kontamináció veszélyével, így a többszörös, alternatív transzkriptumok kimutatásánál ezt a lehetőséget is mérlegelnünk kellett. Ellene szól azonban az, hogy az eredmény ismételt vizsgálatok során is igazolható volt, a negatív kontrollként alkalmazott, vizet és reakcióelegyet tartalmazó cs b l kontaminációra utaló nukleinsav nem volt kimutatható, valamint a fúziós transzkriptumok jó része csak ezekben a mintákban volt azonosítható, a gyakoribb alternatív transzkriptumokat pedig a paraffinos minták vizsgálata igazolta.

A módszer optimalizálása során, még a betegminták vizsgálatának megkezdése előtt az SK-ES-1 sejtvonal egyik kiegészítő passzázsból származó RNS vizsgálata is többféle EWSR1-FLI1 transzkriptumot mutatott ki. Az eddig leírt EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzlokáció mellett ebben a sejtvonal-passzázsban az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) alternatív transzkriptum is megjelent. Korai passzázsokból azonban az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) nem volt kimutatható.

7.2.1. Irodalmi áttekintés

Az öt beteg mintájában tapasztalt többszörös fúziós transzkriptum jelensége szokatlan ugyan a Ewing-családba tartozó tumorok esetén, de az onkogenetikában nem ismeretlen. A desmoplastikus kis kereksejtes tumorokban (Liu és mtsai 2000), a synovialis sarcomában (Yang és mtsai 2002), világossejtes sarcomában (Wang és mtsai 2009, Jakubauskas és mtsai 2011) vagy az ETV6/ABL1-, illetve PML/RAR -pozitív leukémiában (De Braekeleer és mtsai 2011, Pandolfi és mtsai 1992) is leírtak többféle kiméra transzkriptumot ugyanannál a betegnél. Ugyan az EFT esetében a többszörös fúziós transzkriptumok jelenlétének lehetősége nem közzismert, a Ewing-családba tartozó tumorok első molekuláris genetikai diagnosztizálása óta több esetben is publikáltak hasonló eseteket (10. táblázat).

10. Táblázat EFT-mintákban azonosított többszörös fúziós transzkriptumok el fordulásának összefoglaló táblázata hivatkozással

Szerz	Tumorminták száma/összes tumorminta	Alternatív transzkriptumok
May és mtsai 1993	1 (TC-32 sejtvonala)	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) in-frame
Zucman és mtsai 1993	4/89 (tumorminta)	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) in-frame EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6) out-of-frame EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) in-frame EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) out-of-frame EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 5) in-frame EWSR1(ex 8,10)-FLI1(ex 5) out-of-frame EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 8) in-frame EWSR1(ex 8,10)-FLI1(ex 8) out-of-frame
Zoubek és mtsai 1994	1/30 (sejtvonala metasztázisból)	EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 4) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 4) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 9) in-frame
de Alava és mtsai 1998	1/112 (tumorminta)	EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 5) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) in-frame
Minoletti és mtsai 1998	1 (tumorminta)	EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6) in-frame EWSR1(ex 7)-erg3-ERG(ex 6) in-frame
Yoshino és mtsai 2003	1/3 (tumorminta)	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) ?</i> in-frame <i>EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) ?</i> out-of-frame <i>EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) ?</i> in-frame

Szerz	Tumorminták száma/összes tumorminta	Alternatív transzkriptumok
Wang és mtsai 2007	1/4 (EFT-hasonló tumorminta ritka EWSR1R1 transzlokációval)	EWSR1(ex 7)-SP3(ex 6) in-frame EWSR1(ex 8)-kriptikus exon (EWSR1 intron 8)-SP3(ex 6) in-frame
Bielack és mtsai 2004	1 (tumorminta)	EWSR1-ERG (primer tumor) EWSR1-FLI1 type 5 (szekunder tumor)
Lewis és mtsai 2007	1/43 (50) (tumorminta)	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) (primer) EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) (metasztázis)
Összesen	12/284	
Jelen vizsgálatunk	5/22 beteg tumormintája	EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) in-frame EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6) out-of-frame EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) out-of-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) in-frame EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) out-of-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) in-frame EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) out-of-frame EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) in-frame EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5^8) in-frame

Az els többszörös kiméra transzkriptumok leírását a TC-32 elnevezés sejtvonala molekuláris genetikai vizsgálata kapcsán közölték (May és mtsai 1993). A sejtvonalba EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) és EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) transzkriptumokat egyaránt azonosították. Zucman tanulmányában (Zucman és mtsai 1993) az EWSR1-FLI1 transzlokációk töréspontjának feltérképezése során négy mintában azonosítottak két különböző EWSR1-FLI1 szekvenciájú RNS-t. Mind a négy mintában az EWSR1-FLI1 fúziós izoformák egyike in-frame, míg a másik out-of-frame transzkriptumnak bizonyult, mely utóbbiról egy korai stopkodon révén csak csonka, az FLI1 gén DNS-kód doménjának hiányában inaktív fehérje íródik át. Három mintában a duplex fúziós transzkriptumok az EWSR1 gén 9. exonjának, míg egy mintában a 8. exonjának a kivágódásában különböztek. Zoubek (Zoubek és mtsai 1994) közleményében egy tumormintában azonosított öt kiméra transzkriptumról számol be, az EWSR1 9. intronjában elhelyezked egyetlen transzlokációs töréspont mellett. De Alava és Yoshino tanulmányai (De Alava és mtsai 1998, Yoshino és mtsai 2003) két, valamint három különböző EWSR1-FLI1 transzkriptumról számolnak be egy-egy tumorminta kapcsán, bár Yoshino transzkriptumai csak elektroforézis és Bioanalyzer készülék segítségével lettek azonosítva, szekvenálás nem történt a feltételezett bázissorrend megerősítésére, így eredménye kell óvatossággal kezelend. Minoletti (Minoletti és mtsai 1998) kutatása során két in-frame EWSR1-ERG transzkriptumot mutatott ki egy EFT-tumormintában, melyek közül az egyik az ERG gén egy alternatív transzkriptumából származó szekvencia inzerciójával jött létre. Ewing-sarcomához hasonló (Ewing's sarcoma like) tumormintában azonosított két in-frame EWSR1-SP3 transzkriptumról számolt be Wang (Wang és mtsai 2007), melyeket fként az EWSR1 8. intronjából származó kriptikus exon olvasókeretet meg r z beépülése különböztet meg egymástól. Bielack és Lewis tanulmányaikban (Bielack és mtsai 2004, Lewis és mtsai 2007) ezzel szemben primer és szekunder tumorban, valamint primer tumorban és metasztázisában azonosítottak különböző EFT-specifikus transzkriptumokat.

Lewis ugyanebben a közleményében két lehetséges magyarázatot vázol fel a multiplex kiméra transzkriptumok Ewing-családba tartozó tumorokban való megjelenésére. Az egyik elmélet szerint a jelenség háttérében két kromoszomális átrendezés állhat, mely poliklonalitás útján, vagy pedig két különböző tumor egyidejűleg /egymás utáni kialakulása révén jöhet létre. Ugyan ismert a tumorsejtek örökít

anyagának fokozott instabilitása, de két ugyanolyan jelleg kromoszómaváltozás kialakulásának esélye még így is rendkívül kicsi. A Bielack által ismertetett eset (Bielack és mtsai 2004) azonban, melyben különböző, EWSR1-FLI1, valamint EWSR1-ERG transzkriptumokat azonosítottak primer EFT-tumorban és metasztázisában, megerősíti ennek az elméletnek a lehetőségét.

Az egy tumormintában előforduló többszörös EWSR1-ETS transzkriptumok legvalószínűbb magyarázatát azonban az mRNS alternatív splicingja adja, mely a humán gének alternatív fehérjék változatosságának egyik legfontosabb mechanizmusa. Nem csak az egészséges sejtek génexpressziójában van nagy jelentősége, de ismert bizonyos fehérjék alternatív transzkriptumainak összefüggése is egyes tumorokkal (Roy és mtsai 2005, Venables 2006, Skotheim és Nees 2007, Grosso és mtsai 2008). Az alternatív splicing EFT-mintákban való előfordulására Zucman már 1993-ban felhívta a figyelmet korábban említett tanulmányában (Zucman és mtsai 1993), melyben egyetlen feltérképezett töréspont ellenére négy EFT-mintában kétféle EWSR1-FLI1 transzkriptumokról számolt be.

7.2.2. Az EFT-mintákban azonosított többszörös EWSR-FLI1 transzkriptumok jellemzése

A Bielack által közölt eset kivételével tizenegy, szakirodalomban fellelt, EFT-mintákban azonosított többszörös EWSR1-ETS transzkriptumra (May és mtsai 1993, Zucman és mtsai 1993, Zoubek és mtsai 1994, de Alava és mtsai 1998, Minoletti és mtsai 1998, Yoshino és mtsai 2003, Wang és mtsai 2007, Lewis és mtsai 2007) (10. táblázat) az alternatív splicing mechanizmusa adja a legelfogadhatóbb, valamint Zucman eredményei fényében a legmegalapozottabb magyarázatot. E tizenegy tumormintában nyolc esetben az EWSR1 gén, három esetben az FLI1 gén, valamint egy-egy esetben az ERG gén, illetve az SP3 gén szekvenciárészlete vágódik ki az alternatív splicing révén (két esetben mindkét transzlokációs partner szekvenciáját érinti az alternatív splicing, ezért nem egyezik az esetek és a minták száma). Wang, illetve Minoletti esetének kivételével, ahol a kivágódó fragmentumok nem exonok, hanem kriptikus exonként funkcionáló intronikus szekvenciák, az alternatív splicing exonokat távolít el, tisztelben tartja az exonhatárokat, és elsősorban az EWSR1 gént érinti. A Wang által ismertetett eset, azon túl, hogy Ewing-sarcomához hasonló tumormintában

azonosított többszörös transzkriptumokat, valamint az alternatív splicing az EWSR1-SP3 gének transzlokációjáról átíródó mRNS-en ment végbe, különleges abból a szempontból is, hogy az EWSR1-szekvencia nemcsak egy intronikus SP3 génrészleten keresztül illeszkedik az SP3 6. exonjához, de az SP3 6. exonja egyik transzkriptumban sem teljes szekvenciájú. A rövidebb transzkriptumban az EWSR1 7. exonja az SP3 gén 6. exonjának 48. nukleotidjához kapcsolódik, a másik alternatív transzkriptumban pedig az EWSR1 8. exonja az intronikus szekvencián keresztül az SP3 6. exonjának 26. nukleotidjához illeszkedik. Azaz voltaképpen ebben az Ewing-sarcomához hasonló tumormintában a Zoubek által közölt esethez (Zoubek és mtsai 1994) hasonlóan az alternatív splicing mindkét partnere gén szekvenciáját érinti.

Az általunk ismertetett öt minta esetében, melyekben többszörös EWSR1-FLI1 transzkriptumokat azonosítottunk, két esetben érintette az alternatív splicing az EWSR1 gén exonjait, két esetben az FLI1 gén exonjait, valamint egy további esetben, melyben három különféle kiméra transzkriptumot azonosítottunk, mind az EWSR1, mind az FLI1 gének exonjainak kivágódására van példa.

Hat korábban, valamint három általunk vizsgált és ismertetett tumorminta esetében azonosítottunk legalább két különböző, aktív fehérje szintetizálására alkalmas in-frame transzkriptumot. Nem ismert, hogy ezen esetekben a több különböző onkogén fúziós fehérje jelenléte befolyásolja-e valamilyen módon a tumor patogenezisét, vagy pedig módosítja-e bármilyen mértékben a betegség prognózisát. Ennek megítéléséhez nagyobb számú, jobban dokumentált esetek vizsgálatára lenne szükség. Ugyanakkor szükséges megjegyezni, hogy a legújabb, már említett, nagy esetszámú vizsgálatok (Le Deley és mtsai 2010, van Doorninck és mtsai 2010) nem találtak összefüggést a különböző EWSR1-FLI1 típusok és a Ewing-családba tartozó tumorok kórlefolyása között, ami alapján feltételezhető, hogy az alternatív splicing jelenségének sokkal inkább az EFT kialakulása szempontjából van jelentősége, mint prognosztikai szempontból.

Hat el z leg, valamint három általunk közölt esetben, összesen hét különböző alternatív transzkriptumban érintette valamilyen módon az alternatív splicing az EWSR1 8.exonját (EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 8,10)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8,10)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 8)-kriptikus exon (EWSR1 intron 8)-SP3(ex 6)). Ezen

alternatív transzkriptumok mindegyike, egy kivétellel, out-of-frame, azaz olvasási keret eltolódással járó transzkriptumok, melyek biológiailag inaktív, az FLI1-fehérje C-terminális aktivációs doménjét nem tartalmazó csonka kiméra fehérjét eredményeznek, az olvasási keret eltolódása következtében létrejövő korai stopkodon révén. Egyedül az EWSR1(ex 8)-kriptikus exon (EWSR1 intron 8)-SP3(ex 6) transzkriptumról szintetizálódik teljes, aktív fúziós fehérje, mely megtartja onkogén jellegét, mivel ebben az esetben a kriptikus exon transzkriptumba való beékelése helyreállítja az eredeti olvasási keretet.

Az olvasási keret eltolódásának oka, hogy az EWSR1 8. és 9. exonja 181, ill. 38 bázispárból áll, ami külön-külön nem, csak együttesen osztható hárommal, az olvasási keret alapjául szolgáló kodont alkotó bázispárok számával. Így ha az EWSR1 8. vagy 9. exonja egyedül szerepel csak a fúziós transzkriptumban, azaz az alternatív splicing a 8. és 9. exonok határán lép m ködésbe, a kodonokon alapuló olvasási keret megváltozik. Ezzel szemben az EWSR1 10., valamint az FLI1 4., 5., 6., 7. és 8. exonjai hárommal osztható számú bázispárból állnak, azaz részvételük a fúziós transzkriptumban nem befolyásolja a kodonok elhelyezkedését.

A szakirodalomban fellelhet tíz, valamint az általunk közölt öt, többszörös fúziós transzkriptumot tartalmazó EFT tumorminta közül, nagyobb részben, összesen nyolc esetben az in-frame transzkriptumok mellett out-of-frame kiméra transzkriptumok is azonosíthatók voltak. Az EWSR1 és FLI1 gének közötti töréspont-meghatározások eredménye szerint (Zucman és mtsai 1993, Zucman-Rossi és mtsai 1998) a transzlokációs töréspont az EWSR1 gén 8. exonja és az FLI1 gén exonjai között megközelít leg ugyanolyan számban fordult el, mint az EWSR1 gén 7. exonját követő töréspont, mely utóbbi a tanulmányok eredményei alapján az EWSR1-FLI1 transzlokációk kb. 1/3-át teszi ki. Ha tehát csak az EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokációkat vesszük számításba, akkor is az alternatív splicing eddigi tapasztaltaknál jóval gyakoribb el fordulásával kell számolni, hiszen az EWSR1 gén 8. exonját követő intronikus töréspontok esetében az alternatív splicing biztosítja az egyetlen lehetőséget a biológiailag aktív onkogén fúziós fehérje szintetizálására. Az EFT patogenezisében tehát az esetek figyelemreméltó, mintegy 1/3 részében az alternatív splicing jelentős szerepet tölthet be.

A Ewing-családba tartozó tumorok szakirodalmából összegyűjtött tizenkét, többszörös EWSR1-ETS transzkriptumot tartalmazó minta molekuláris genetikai eredményére 284 EFT-minta vizsgálata során tettek szert a szerzők. Saját feldolgozású, 22 beteg frissen fagyasztott EFT-mintáinak molekuláris genetikai vizsgálata során öt esetben azonosítottunk több különböző kiméra transzkriptumot ugyanabban a tumormintában. Az alternatív splicing korábbi vizsgálatok során feltárt, összesen kb. 4%-os előfordulásához képest a jelen vizsgálatokban viszonylagosan gyakoribb, 22%-os előfordulása az eddigi megállapítások fényében, elsősorban az EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokáció típus gyakori előfordulására vonatkozó adatok alapján nem lehet véletlen. Valószínűleg tehát, hogy az általam alkalmazott molekuláris genetikai módszereknek, azaz a nested és multiplex PCR, valamint a lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis ötvözésének köszönhető az alternatív splicing eredményezte többszörös fúziós transzkriptumok nagyobb arányú észlelése. Az általam alkalmazott metodikák alkalmasabbnak tartanak a többszörös fúziós transzkriptumok amplifikálására, és érzékenyebbnak bizonyulhatnak az egyes sokszorosított PCR-termékek kimutatása során.

Feltételezem továbbá, hogy a többszörös kiméra transzkriptumok előfordulása EFT-mintákban nemcsak gyakoribb az eddigi tapasztaltaknál, de ugyanabban a mintában a különböző kiméra transzkriptumok kifejeződése között is nagy különbségek lehetnek. Erre utal az a jelenség, hogy a frissen fagyasztott EFT-mintákban kimutatott többszörös fúziós transzkriptum közül ugyanazon betegek formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintáiban túlnyomórészt csak egy, de szinte mindig a leggyakoribb előfordulású in-frame transzkriptum azonosítható. A jelenséget nem magyarázza kielégítően az RNS-degradáció, mivel az EWSR1 és FLI1 primerszettek alkalmazása révén a különböző kiméra transzkriptumok hosszában csupán 10-20 bázispárnyi különbség mutatkozik. Mindez arra utal, hogy az in-frame transzkriptumok paraffinos mintákban való kimutathatósága mögött jelentős koncentráció-különbségnek is meg kell bújni, és a kisebb mértékben kifejeződő out-of-frame, illetve többi in-frame transzkriptumok mennyisége az RNS-degradáció következtében a kimutathatósági küszöb alá csökken, míg a nagyobb mértékben átíródó in-frame transzkriptumok még azonosíthatóak. Ezek a megfigyelések és következtetések egybevágóak egyes korábbi (Zoubek és mtsai 1994, Wang és mtsai 2007) eredményekkel. Zoubek ugyanis a négy különféle kiméra

transzkriptum kimutatása során az egyik, méghozzá az EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 4) transzkriptumot nagyobb mennyiségben tudta amplifikálni, mely megfigyelés összhangban volt az EWSR1 gén 9. és az FLI1 gén. 4. exonja között észlelt törésponttal is. Wang hasonló módon, az EWSR1-SP3 transzkriptumok RT-PCR módszerrel történő sokszorosítása során a PCR-termékek között a rövidebb alternatív transzkriptum túlsúlyát észlelte a hosszabb fúziós transzkriptum mennyiségéhez képest.

Egy kivételt találtunk az frissen fagyasztott és a paraffinos metszetek között tapasztalt eltérések alól: a 19. beteg frissen fagyasztott mintájában csak két in-frame (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7)), a paraffinos mintájában azonban ezeken kívül még egy out-of-frame kiméra transzkriptumot (EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7)) is sikerült azonosítani. A frissen fagyasztott, valamint a paraffinos metszet egyazon biopsziából származik, azaz ugyanannak az eredeti tumormintának a részei. Miután az RNS-degradáció az archív mintában csökkenti a kimutatható RNS-mennyiséget, a jelenségre nincs egyértelmű magyarázatom. Lehetséges, hogy a két mintában valóban létezett a fúziós transzkriptumok számában megmutató minőségi különbség, ami ugyanazon tumorsejtek különböző kódolásával, esetleg klonalitással magyarázható. Ezt az elméleti feltevést lehet megcáfolni az SK-ES-1 sejtvonallal kapcsolatos eredményeink, melyek szerint egy későbbi passage-ból származó RNS-ben két különböző, egy in-frame és egy out-of-frame kiméra transzkriptumot azonosítottunk, azonban a korai passage-ban csak az ismert, in-frame transzkriptum volt megtalálható. Természetesen az is felmerül lehetőséggént, hogy a frissen fagyasztott mintában is jelen volt az out-of-frame transzkriptum, de a multiplex PCR, mely lehetővé teszi több termék sokszorosítását különböző, vagy akár azonos primerek segítségével, a kisebb mennyiségben jelenlévő templátot ebben az esetben nem amplifikálta kimutatható mértékben.

Zucman-Rossi tanulmányai (Zucman és Mitsai 1993, Zucman-Rossi és Mitsai 1998) alapján nagyjából megállapítható az EWSR1 8. exonját követő töréspont figyelemreméltó gyakorisága, ugyanakkor az EFT-mintákon végzett nagyszámú nemzetközi molekuláris genetikai diagnosztikus vizsgálatok eredményei nem tükrözik ezt a töréspont-gyakoriságot. Saját vizsgálataim során az EWSR1(ex 8)-FLI1 transzkriptumokat huszonhárom mintából 3 mintában azonosítottam, mely a transzkriptumnak megfelelő transzlokáció korábban tapasztalt 33%-os előforduláshoz

képest csak 13%. Bár az általam vizsgált, fagyasztott EFT-tumorminták száma nem túl nagy, valószínűleg nem minden EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokációról íródik át EWSR1(ex 8)-FLI1 transzkriptum, vagy pedig nem íródik át kimutatható mennyiségben. Így lehetséges, hogy a EWSR1(ex 8)-FLI1 transzkriptumok az esetek egy részében mutathatók csak ki a tumormintákban, tehát az egyetlen EWSR1(ex 7)-FLI1 transzkriptumot tartalmazó tumorminták egy részében is EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokáció valószínűsíthető. Az out-of-frame fúziós transzkriptumok kifejezése tehát biológiailag jelentős szerep hiányában igen esetleges jelenség lehet, illetve lehetséges, hogy az egyes mintákon tapasztalt változásai a kifejezésnek, pl. az SK-ES-1 sejtvonalnál vagy a 19. beteg mintáinál tapasztaltak a tumorsejteket ért valamilyen belső vagy külső, környezeti hatás függvénye.

Az összes közölt esetet figyelembe véve a 16, alternatív splicing által érintett EFT-tumormintából 4 esetben valószínűsíthető EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokáció, ami az esetek 25%-a. Ennek megfelelően az összes alternatív splicinggal magyarázható eset mintegy 3/4-e nem vezethető vissza egyértelműen EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokáció jelenlétére. Sőt, a 16 esetből ötben (31%) az EWSR1 génszekvencián nem, csak a transzlokációs partner szekvenciáján azonosítható kivágódás, illetve hét esetben (44%) az EWSR1 8. exonját követő exonok is részei a fúziós transzkriptumok szekvenciájának. Így az EWSR1(ex 8)-FLI1 transzkriptumot nem tartalmazó, de többszörös fúziós transzkriptumot hordozó tumorminták (12 minta a tizenhatból) nagy valószínűséggel nem az EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokáció típusát hordozzák.

A biztosan EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokációjú esetek aránya (25%) és a valószínűleg, ill. biztosan az EWSR1(ex 8)-FLI1-t eltérő transzlokációjú esetek aránya (75%) közötti nagy különbség alapján nem zárható ki, hogy az alternatív splicing jelenségének a Ewing-családba tartozó tumorok esetén az EWSR1(ex 8)-FLI1 transzlokációjú tumorok sikeres patogenezisének kívül más szerepe is lehetséges. Az alternatív splicing pontos jelentősége, pl. a tumoron belüli klón valamilyen evolúciós elnyújtás biztosító esetleges szerep feltárása későbbi, nagyobb esetszámú vizsgálatok célja lehet.

7.2.3. Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációs típusok és a klinikai kép összefüggései

Az egyes EWSR1-FLI1 transzlokáció típusok eseménymentes, illetve teljes túlélésre vonatkozó prognosztikai jelentőségét Zoubek és munkatársai, (Zoubek és mtsai 1996), illetve De Alava és munkacsoportja (de Alava és mtsai 1998) vetették fel els ként a 90-es évek második felében, akik az 1. típusú EWSR1-FLI1 transzlokációt hordozó EFT-betegek esetében találtak jobb kimenetelt.

Legutóbb szintén két munkacsoport (Le Deley és mtsai 2010, van Doorninck és mtsai 2010) tett pontot az elhúzódó vita élére, nagyszámú betegcsoporton végzett EFT-transzlokáció és a klinikai kép közötti összefüggések vizsgálatával (4.4.1. fejezet). Eredményeik szerint, feltételezeten a jelenlegi intenzív kemoterápiás kezelés mellett, nem észlelhet szignifikáns genotípus-fenotípus összefüggés, és egyik EWSR1-ETS transzlokáció esetében sem beszélhetünk szignifikánsan jobb vagy esetleg rosszabb kimenetelről.

Annak ellenére, hogy munkám els sorban metodikai jelentőségű, és ezekkel a komoly genotípus-fenotípust elemző közlésekkel nem is volt céлом felvenni a versenyt, a II. sz. Gyermekklinika Tumorregiszterében tárolt adatok alapján felmerült az igény a hazai EFT-beteg populáción is ellenőrizni a Ewing tumorok családjára specifikus transzlokációk spektruma és a betegek túlélése közötti lehetséges összefüggéseket. A 43 vizsgált beteg közül 25 gondozásának adatai szerepeltek a II. sz Gyermekklinika Tumorregiszterében, azonban 18 beteg esetében nem volt követhető a biopsziát/tumorrezekciót követő ellátás. A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájának Tumorbankjában tárolt minták és a II. sz Gyermekklinika Tumorregiszterében tárolt adatok közötti részleges átfedés els sorban annak köszönhető, hogy számos 18 évét betöltött beteg a felvett ellátásban folytatta a kezelését, melyről nem állnak rendelkezésre. Néhány gyermek hiányos vagy hiányzó utánkövetése pedig feltételezhetően annak tulajdonítható, hogy a biopsziát vagy a tumorrezekciót követően nem járt kontrollokra, vagy nem hazai intézményben folytathatta a gyógykezelését.

A jelenleg rendelkezésre álló adatok, els sorban a pontosan dokumentált betegek kis száma miatt (11. táblázat), mely a vizsgálandó transzlokációs típusokra

bontás esetén tovább csökkenne, egyelőre nem teszünk lehetőséget megbízható statisztikai összefüggések elemzését.

Izgalmasnak ígérkezne az a kérdésfeltevés is, hogy az egy tumormintában azonosított többszörös fúziós transzkriptumok mennyiben befolyásolják a klinikai képbontakozását, a túlélési adatok alakulását. Ugyanakkor a vizsgált betegcsoportból öt esetben mutattunk ki multiplex fúziós transzkriptumokat, és ez a mintaszám szintén túl alacsony megbízható statisztikai elemzés véghezvitelére. A 11. táblázat tartalmazza a vizsgált betegek túlélési adatait, akiknél ez elérhető. Az adatok áttekintésekor azonban egyértelmű tendenciák sem az EWSR1-FLI1, sem a multiplex fúziós transzkriptumok esetében nem olvashatók ki a táblázatból, ami a mi adataink alapján is a szoros genotípus-fenotípus összefüggések ellen szól.

11. Táblázat A molekuláris genetikai vizsgálatnak alávetett tumorminták vizsgálati eredménye, valamint a betegek túlélési adatainak táblázata (exit-elhunyt, CR-teljes remisszió, PR- részleges remisszió)

Beteg sor-száma	Beteg kora (év)	Hisztopatológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum	A beteg jelen státusza	Eseménymentes túlélés (nap)	Teljes túlélés (nap)
1.	17	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)</i>	exit	419	726
2.	16	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i> <i>EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6)</i> <i>EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8)</i>	exit	589	1079
3.	7	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i>	CR	3381	3381
4.	14	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i> <i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8)</i>	exit	603	872
5.	17	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i>	exit		194
6.	18	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>	exit	1162	2377
7.	16	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5)</i> <i>EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5)</i>	CR	3894	3894
8.	15	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i>			
9.	18	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6)</i>	CR	4320	4320

Beteg sor-száma	Beteg kora (év)	Hisztopatológiai diagnózis	Kimutatott fúziós transzkriptum	A beteg jelen státusza	Esemény-mentes túlélés (nap)	Teljes túlélés (nap)
10.	15	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i>	CR	3499	3499
11.	34	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>			
12.	14	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>	exit	478	901
13.	19	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>			
14.	17	ES	<i>EWSR1(ex 10)-FLII(ex 6)</i>	PR		3233
15.	5	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>	exit		400
16.	18	ES	—			
17.	15	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>	CR	1285	1285
18.	4	SRCT, ES/ pPNET?	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>	CR	3003	3003
19.	14	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 7)</i> <i>EWSR1(ex 9)-FLII(ex 7)</i>	CR	3019	3019
20.	9	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i> <i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5^8)</i>	CR	2588	2588
21.	17	ES	<i>EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6)</i>	exit	118	478
22.	62	pPNET	—	—		—
23.	21	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 6)</i>	PR	473	473
24.	21	ES	—	—		—
25.	13	ES	—	—		—
26.	41	SRCT, EFT	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i>	—		—
27.	27	ES	<i>EWSR1(ex 7)-FLII(ex 5)</i>	—		—
28.	24	SRCT, ES?	—	—		—
29.	18	SRCT	—	—		—
30.	19	ES, SRCT	<i>EWS(ex 7)-FLI(ex 6)</i>	—		—

31.	21	SRCT, ES?	<i>EWSRI(ex 7)-FLII(ex 5)</i>	—		—
32.	18	ES	—	CR	3647	3647
33.	6	ES	—	CR	1447	1447
34.	26	ES	<i>EWS(ex 7)-FLI(ex 5)</i>	—		—
35.	27	ES	—	—		—
36.	16	ES	—	exit		167
37.	13	ES	—	CR	2209	2209
38.	11	ES	<i>EWSRI(ex 7)-FLII(ex 7)</i>	CR	4240	4240
39.	17	ES	—	exit		1400
40.	8	ES	—	exit		1297
41.	25	ES	<i>EWS(ex 7)-FLI(ex 6)</i>	—		—
42.	20	ES	<i>EWS(ex 10)-FLI(ex 6)</i>	—		—
43.	27	ES	<i>EWS(ex 7)-FLI(ex 6)</i>	—		—

8. Következtetések – a munka jelentősége

➤ Jelen munkám során új módszert dolgoztam ki a Ewing-családba tartozó tumorokra jellemző EWSR1-FLI1, valamint EWSR1-ERG transzlokációkról átródozó mRNS-ek kimutatására. Az új módszer monoplex vagy multiplex RT-PCR-en, továbbá fluoreszcens, multiplex nested PCR-t követően lézer-indukált, fluoreszcens kapilláris elektroforézisen, és a kimutatást megsértő szekvenáláson alapul. Ez a metodika alkalmas mind frissen fagyasztott, mind a degradált RNS-t tartalmazó formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákban az összes lehetséges EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptum azonosítására.

➤ A bemutatott új módszert alkalmazva vizsgáltam a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján működő Tumorbank 23 frissen fagyasztott, és 60 paraffinba ágyazott, immun-hisztológiai módszerekkel többségében a Ewing-családba tartozó tumorként diagnosztizált tumormintáját, mely esetszám nemcsak a legnagyobb, közölt molekuláris genetikai vizsgálat Magyarországon, de nemzetközi szinten is jelentősnek számított.

➤ A frissen fagyasztott EFT-minták 91%-ában, a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott tumorminták 60%-ában sikerült molekuláris genetikai módszerekkel igazolni az EFT diagnózist. A paraffinos minták vizsgálatára kidolgozott módszer nehézségeit, gyenge pontjait áttekintve javaslatokat fogalmaztam meg a módszer kisebb módosításaira, mely lehet végezni a transzlokációk és transzlokáció típusok heterogenitása, valamint az archivált mintákban tapasztalt RNS-degradáció miatt nehézségekbe ütköző molekuláris genetikai diagnosztika számára egy kis RNS- és reakcióelegy igényű alternatív vizsgálati módszer alkalmazását.

➤ Az összes EFT-minta molekuláris genetikai vizsgálata során tíz különböző EWSR1-FLI1 és egy EWSR1-ERG fúziós transzkriptumot sikerült azonosítanom, közülük kettőt, az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) és EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) transzkriptumokat legjobb tudásom szerint mi közöltük elsőként.

➤ A magyar EFT-minták vizsgálata során észlelt EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumok előfordulási gyakorisága megegyezett a nemzetközi adatokkal.

➤ Mintegy öt beteg esetében több EWSR1-FLI1 transzkriptumot is azonosítottunk ugyanabban az EFT-mintában. A jelenség legvalószínűbb magyarázatát eddigi ismereteink alapján az alternatív splicing mechanizmusa nyújtja.

➤ Az összes, többszörös fúziós transzkriptumot tartalmazó EFT-minta vizsgálati eredményének ismeretében az alternatív splicing viszonylag gyakori jelenség: előfordulási gyakorisága az eddig közölt esetek alapján kb. 4%, a jelen kutatás eredményei szerint 22%, de a transzlokációs töréspontok ismert eloszlása alapján előfordulása akár a 30%-ot is meghaladhatja.

➤ Az alternatív splicing a Ewing-családba tartozó tumorerkek jelentős részének patogenezisében fontos szerepet játszik, lehetőséget nyújtva az out-of-frame transzkriptummal és ebben a következőkben biológiailag inaktív fehérje szintetizálásával járó esetekben az in-frame mRNS átírására és aktív onkogén fehérje létrehozására. A többszörös fúziós transzkriptumok háttérében álló in-frame transzlokációjú esetek feltehetően jelentős száma pedig felveti az alternatív splicing további, egyelőre ismeretlen szerepét is.

➤ Az EFT-betegek tumormintáiban azonosított EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokáció típusok, a multiplex fúziós transzkriptumokat mutató esetek, valamint a betegek túlélési adatai közötti esetleges összefüggéseket a jól dokumentált esetek kis száma miatt nem tudtuk vizsgálni.

9. Összefoglalás

A Ewing-családba tartozó tumorok (EFT) közös jellemzője az EWSR1 gén valamint egy, az ETS-családba tartozó gén közötti transzlokáció. A partner gén az esetek mintegy 95%-ában az FLI1 és az ERG gén. Jóval kisebb gyakorisággal ugyan, de több más ETS gén is alkothat transzlokációt az EWSR1 génnel, valamint közöltek olyan ritka EFT-eseteket is, melyekben mindkét partnert helyettesíthetik más gének. Az EFT-re specifikus transzlokációk heterogenitása megmutatkozik a töréspont elhelyezkedésétől függő változatosságban is, mely az EWSR1-FLI1 transzlokáció esetében 24 különböző transzlokáció típus kialakulásához vezethet. Az EFT RNS-alapú diagnosztikáját a transzlokációk heterogenitásán túl tovább nehezíti az RNS-degradáció, mely főként a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták vizsgálatát teszi kihívássá.

Munkámban fő célom volt egy olyan új molekuláris genetikai módszer kidolgozása, mely alkalmas a két leggyakoribb, EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokáció kimutatására, valamint a frissen fagyasztott minták mellett a paraffinos EFT-minták vizsgálatára is.

RNS izolálás után, erre a célra tervezett primer szettek segítségével monoplex vagy multiplex RT-PCR és ezt követően fluoreszcens multiplex nested PCR keretében amplifikáltam a fúziós transzkriptumokat. A PCR-termékeket lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis módszerével mutattam ki és azonosítottam, eredményeimet pedig szekvenálás útján erősítettem meg.

Ezzel a módszerrel a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján működő Tumorbankból 22 beteg 23 frissen fagyasztott, valamint 47 beteg 60 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintáját vizsgáltam meg. A frissen fagyasztott minták 91%-ában, a paraffinos minták közül pedig 60%-ban sikerült molekuláris genetikai vizsgálattal is megérősíteni az immun-hisztológiai diagnózist. Az EFT-minták vizsgálata során öt beteg mintájában több fúziós transzkriptumot is azonosítottam. A többszörös fúziós transzkriptumot tartalmazó saját, illetve korábban közölt EFT-esetek áttekintése után arra a következtetésre jutottam, hogy a jelenség háttérében álló alternatív splicing gyakori jelenség, bizonyos transzlokáció típusoknál jelentős szerepet játszik a tumor patogenezisében, de valószínűleg ezen túlmutató, eddig ismeretlen szerepe is.

10. Summary

The Ewing family of tumours (EFT) is characterized by the translocation between the EWSR1 gene and one of the genes belonging to the ETS family. In 95% of cases the translocation partners are the FLI1 and ERG genes, however other ETS genes can also form translocations with the EWSR1 gene. Furthermore there is ample evidence now that both partners of the EFT-associated translocations are interchangeable. The diversity of localisation of the translocation breakpoint is responsible for the further heterogeneity of EFT-specific translocations, and may result in 24 different alternative forms of EWSR1-FLI1 translocation. The RNA-based molecular diagnostics of EFT is further complicated by the degradation of RNA, which makes the analysis of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples especially difficult.

Our main aim was to establish a new molecular genetic method, that is able to identify the two most common translocations, namely the EWSR1-FLI1 and EWSR1-ERG, and to analyse both the fresh frozen tissue (FFT) and the FFPE tissue samples.

After RNA-isolation, the fusion transcripts were amplified by monoplex or multiplex RT-PCR and subsequent fluorescent multiplex nested PCR, using specially designed primer sets. The PCR products were detected and identified by laser-induced fluorescent capillary electrophoresis and results were confirmed by sequence analysis. By this method we processed EFT samples received from the tumour bank at the Department of Orthopaedics, Semmelweis University, Budapest: in all 23 fresh frozen samples and 60 FFPE samples of 22 and 47 EFT patients, respectively. This molecular genetic method shows 91% and 60% sensitivity in the confirmation of the immunohistological diagnosis of EFT in case of FFT and FFPE, respectively. In the course of the analysis of the FFT samples multiple fusion transcripts were found in five patients' samples. After reviewing the previously reported EFT-cases with multiple fusion transcripts and our own results as well, we came to the conclusion that alternative EWSR1-ETS splicing which accounts for the phenomenon of multiple fusion transcripts, is a frequent event, and in certain cases can play an important role in the pathogenesis of the Ewing family of tumours. However it is presumable that there is an unknown role of the alternative splicing as well.

11. Irodalomjegyzék

- Adams V, Hany MA, Schmid M, Hassam S, Briner J, Niggli FK. (1996) Detection of t(11;22)(q24;q12) translocation breakpoint in paraffin-embedded tissue of the Ewing's sarcoma family by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol.* 2:107-13.
- Arvand A, Welford SM, Teitell MA, Denny CT. (2001) The COOH-terminal domain of FLI-1 is necessary for full tumorigenesis and transcriptional modulation by EWS/FLI-1. *Cancer Res.* 13:5311-7.
- Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubouset J, Mazabraud A. (1983) Chromosomal Translocations in Ewing's Sarcoma. *N Engl J Med* 309:496-498
- Avigad S, Naumov I, Ohali A, Jeison M, Berco GH, Mardoukh J, Stark B, Ash S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Yaniv I. (2007) Short telomeres: a novel potential predictor of relapse in Ewing sarcoma. *Clin Cancer Res.* 19:5777-83.
- Baer C, Nees M, Breit S, Selle B, Kulozik AE, Schaefer KL, Braun Y, Wai D, Poremba C. (2004) Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer.* 5:687-94.
- Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, Ghysdael J. (1994) DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol.* 5:3230-41.
- Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, Biegel JA, Womer RB. (1995) Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA.* 7:553-7.
- Beauchamp E, Bulut G, Abaan O, Chen K, Merchant A, Matsui W, Endo Y, Rubin JS, Toretsky J, Uren A. (2009) GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. *J Biol Chem.* 14:9074-82.
- Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, Bernstein A. (1991) Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev.* 6:908-18.

- Bertolotti A, Melot T, Acker J, Vigneron M, Delattre O, Tora L. (1998) EWS, but not EWS-FLI-1, is associated with both TFIID and RNA polymerase II: interactions between two members of the TET family, EWS and hTAFII68, and subunits of TFIID and RNA polymerase II complexes. *Mol Cell Biol.* 3:1489-97.
- Braunreiter CL, Hancock JD, Coffin CM, Boucher KM, Lessnick SL. (2006) Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma. *Cell Cycle.* 23:2753-9.
- Bridge JA, Cushman-Vokoun AM. (2011) Molecular diagnostics of soft tissue tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 5:588-601.
- Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, Pfeifer JD, Perry A. (2006) Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. *Mod Pathol.* 1:1-8.
- Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Staeger MS, Müller-Tidow C, Richter GH. (2009) Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle.* 3:1991-6.
- Carrillo J, García-Aragoncillo E, Azorín D, Agra N, Sastre A, González-Mediero I, García-Miguel P, Pestaña A, Gallego S, Segura D, Alonso J. (2007) Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. *Clin Cancer Res.* 8:2429-40.
- Chansky HA, Barahmand-Pour F, Mei Q, Kahn-Farooqi W, Zielinska-Kwiatkowska A, Blackburn M, Chansky K, Conrad EU, Bruckner JD, Greenlee TK, Yang L. (2004) Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Orthop Res.* 4:910-7.
- Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L. (2001) Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res.* 9:3586-90.
- Cheung IY, Feng Y, Danis K, Shukla N, Meyers P, Ladanyi M, Cheung NK. (2007) Novel markers of subclinical disease for Ewing family tumors from gene expression profiling. *Clin Cancer Res.* 23:6978-83.
- Cironi L, Riggi N, Provero P, Wolf N, Suvà ML, Suvà D, Kindler V, Stamenkovic I. (2008) IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in

- mesenchymal progenitor cells. *PLoS One*. 7:e2634. doi: 10.1371/journal.pone.0002634.
- Dagher R, Pham TA, Sorbara L, Kumar S, Long L, Bernstein D, Mackall C, Raffeld M, Tsokos M, Helman L. (2001) Molecular confirmation of Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 4:221-4.
- Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, Delattre O. (2001) Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene*. 25:3258-65.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G. (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 6391:162-5.
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, Aurias A, Thomas G. (1994) The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*. 5:294-9.
- de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Healey JH, Ladanyi M. (2000) Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*. 4:783-92.
- de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG, Ladanyi M. (1998) EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol*. 4:1248-55.
- De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Rowe D, Bown N, Morel F, Berthou C, Férec C, De Braekeleer M. (2011) ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Eur J Haematol*. 5:361-71.
- Deneen B, Hamidi H, Denny CT. (2003a) Functional analysis of the EWS/ETS target gene uridine phosphorylase. *Cancer Res*. 14:4268-74.
- Deneen B, Welford SM, Ho T, Hernandez F, Kurland I, Denny CT. (2003b) PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. *Mol Cell Biol*. 11:3897-908.

- Deng HW, Zhou Y, Recker RR, Johnson ML, Li J. (2000) Fragment size difference between multiplex and singleplex PCR products and their practical implications. *Biotechniques*. 2:298-304, 307-8.
- Dockhorn-Dworniczak B, Schäfer KL, Dantcheva R, Blasius S, Winkelmann W, Strehl S, Burdach S, van Valen F, Jürgens H, Böcker W. (1994) Diagnostic value of the molecular genetic detection of the t(11;22) translocation in Ewing's tumours. *Virchows Arch*. 2:107-12.
- Downing JR, Head DR, Parham DM, Douglass EC, Hulshof MG, Link MP, Motroni TA, Grier HE, Curcio-Brint AM, Shapiro DN. (1993) Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol*. 5:1294-300.
- Ewing J. (1972) Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. Proceedings of the New York Pathology Society, 1921. *CA Cancer J Clin*. 2:95-8.
- Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo C, Suela J, Teixeira MR, Cerveira N, Molares A, Gómez-López G, Pestaña A, Sastre A, Garcia-Miguel P, Cigudosa JC. (2008) Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene*. 14:2084-90.
- Fritsch MK, Bridge JA, Schuster AE, Perlman EJ, Argani P. (2003) Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific fusion transcripts from archival tissue. *Pediatr Dev Pathol*. 1:43-53.
- Fukuma M, Okita H, Hata J, Umezawa A. (2003) Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*. 1:1-9.
- Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. (2004) Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res*. 4:1344-53.

- Fuchs B, Inwards C, Scully SP, Janknecht R. (2004) hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop Relat Res.* 426:64-8.
- Gangwal K, Lessnick SL. (2008) Microsatellites are EWS/FLI response elements: genomic "junk" is EWS/FLI's treasure. *Cell Cycle.* 20:3127-32.
- Giovannini M, Biegel JA, Serra M, Wang JY, Wei YH, Nycum L, Emanuel BS, Evans GA. (1994) EWS-erg and EWS-Fli1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. *J Clin Invest* 94:489-96.
- Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. (2008) The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep.* 11:1087-93.
- Guan H, Zhou Z, Wang H, Jia SF, Liu W, Kleinerman ES. (2005) A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res.* 7:2662-9.
- Hahn KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PH, Thiele CJ, Kim SJ. (1999) *Nat Genet.* 2:222-7.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 5:646-74.
- Hancock JD, Lessnick SL. (2008) A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell Cycle.* 2:250-6.
- Hattinger CM, Pötschger U, Tarkkanen M, Squire J, Zielenska M, Kiuru-Kuhlefelt S, Kager L, Thorner P, Knuutila S, Niggli FK, Ambros PF, Gardner H, Betts DR. (2002) Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. *Br J Cancer.* 11:1763-9.
- Herrero-Martín D, Osuna D, Ordóñez JL, Sevillano V, Martins AS, Mackintosh C, Campos M, Madoz-Gúrpide J, Otero-Motta AP, Caballero G, Amaral AT, Wai DH, Braun Y, Eisenacher M, Schaefer KL, Poremba C, de Alava E. (2009) Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. *Br J Cancer.* 1:80-90.
- Hill DA, O'Sullivan MJ, Zhu X, Vollmer RT, Humphrey PA, Dehner LP, Pfeifer JD. (2002) Practical application of molecular genetic testing as an aid to the surgical

- pathologic diagnosis of sarcomas: a prospective study. *Am J Surg Pathol.* 8:965-77.
- Hisaoka M, Tsuji S, Morimitsu Y, Hashimoto H, Shimajiri S, Komiya S, Ushijima M. (1999) Molecular detection of EWS-FLI1 chimeric transcripts in Ewing family tumors by nested reverse transcription-polymerase chain reaction: application to archival paraffin-embedded tumor tissues. *APMIS.* 6:577-84.
- Honoki K, Stojanovski E, McEvoy M, Fujii H, Tsujiuchi T, Kido A, Takakura Y, Attia J. (2007) Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. *Cancer.* 6:1351-60.
- Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, Wexler LH, Gorlick R, Meyers P, Ladanyi M. (2005) Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol.* 3:548-58.
- Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. (2005) EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 11:4633-44.
- Huret JL . EWSR1 (Ewing sarcoma breakpoint region 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2010. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/EWSR1ID85.html>
- Ida K, Kobayashi S, Taki T, Hanada R, Bessho F, Yamamori S, Sugimoto T, Ohki M, Hayashi Y. (1995) EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor. *Int J Cancer.* 4:500-4.
- Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, Kim SJ. (2000) EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res.* 6:1536-40.
- Jaishankar S, Zhang J, Roussel MF, Baker SJ. (1999) Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. *Oncogene.* 40:5592-7.
- Jakubauskas A, Valceckiene V, Andrekute K, Seinins D, Kanopka A, Griskevicius L. (2011) Discovery of two novel EWSR1/ATF1 transcripts in four chimerical

- transcripts-expressing clear cell sarcoma and their quantitative evaluation. *Exp Mol Pathol.* 2:194-200.
- Jawad MU, Cheung MC, Min ES, Schneiderbauer MM, Koniaris LG, Scully SP. (2009) Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005. *Cancer* 15:3526-36.
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN. (1995) A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene.* 6:1229-34.
- Kang HG, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, May WA, Ng T, Reynolds CP, Triche TJ, Sorensen PH. (2007) E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res.* 7:3094-105.
- Kauer M, Ban J, Kofler R, Walker B, Davis S, Meltzer P, Kovar H. (2009) A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS One.* 4:e5415.
- Kim S, Denny CT, Wisdom R. (2006) Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins. *Mol Cell Biol.* 7:2467-78.
- Kinsey M, Smith R, Lessnick SL. (2006) NR0B1 Is Required for the Oncogenic Phenotype Mediated by EWS/FLI in Ewing's Sarcoma. *Mol Cancer Res* 11:851-9.
- Knoop LL, Baker SJ. (2001) EWS/FLI alters 5'-splice site selection. *J Biol Chem.* 25:22317-22.
- Knoop LL, Baker SJ. (2000) The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. *J Biol Chem.* 32:24865-71.
- Kojima T, Asami S, Chin M, Yoshida Y, Mugishima H, Suzuki T. (2002) Detection of chimeric genes in Ewing's sarcoma and its clinical applications. *Biol Pharm Bull.* 8:991-4.
- Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henöckl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G, Gardner H. (1996) EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ.* 4:429-37.

- Kumar S, Pack S, Kumar D, Walker R, Quezado M, Zhuang Z, Meltzer P, Tsokos M. (1999) Detection of EWS-FLI-1 fusion in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor by fluorescence in situ hybridization using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Hum Pathol.* 3:324-30.
- Leemann-Zakaryan RP, Pahlich S, Sedda MJ, Quero L, Grossenbacher D, Gehring H. (2009) Dynamic subcellular localization of the Ewing sarcoma oncoprotein and its association with and stabilization of microtubules, *J Mol Biol.* 1:1-13.
- Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, Lion T, Poremba C, Marandet J, Ballet S, Pierron G, Brownhill SC, Nesslerböck M, Ranft A, Dirksen U, Oberlin O, Lewis IJ, Craft AW, Jürgens H, Kovar H. (2010) Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol.* 12:1982-8.
- Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. (1995) Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene.* 3:423-31.
- Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR. (2002) The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell.* 4:393-401.
- Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS. (2007) Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol.* 3:397-404.
- Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. (1999) Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 7:1428-32.
- Liu J, Nau MM, Yeh JC, Allegra CJ, Chu E, Wright JJ. (2000) Molecular heterogeneity and function of EWS-WT1 fusion transcripts in desmoplastic small round cell tumors. *Clin Cancer Res.* 9:3522-9.
- Luo W, Milash B, Dalley B, Smith R, Zhou H, Dutrow N, Cairns BR, Lessnick SL. (2012) Antibody detection of translocations in Ewing sarcoma. *EMBO Mol Med.* 6:453-61.

- Mackintosh C, Ordóñez JL, García-Domínguez DJ, Sevillano V, Llombart-Bosch A, Szuhai K, Scotlandi K, Alberghini M, Sciot R, Sinnaeve F, Hogendoorn PC, Picci P, Knuutila S, Dirksen U, Debiec-Rychter M, Schaefer KL, de Álava E. (2012) 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene*. 10:1287-98.
- Mastrangelo T, Modena P, Tornielli S, Bullrich F, Testi MA, Mezzelani A, Radice P, Azzarelli A, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. (2000) A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene*. 33:3799-804.
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT. (1993a) Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12:5752-6.
- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT. (1993b) The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol*. 12:7393-8.
- Meier VS, Kühne T, Jundt G, Gudat F. (1998) Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid determination of exon combinations. *Diagn Mol Pathol*. 1:29-35.
- Minoletti F, Sozzi G, Tornielli S, Pilotti S, Azzarelli A, Pierotti MA, Radice P. (1998) A novel EWS-ERG rearrangement generating two hybrid mRNAs in a peripheral primitive neuroectodermal tumour (pPNET) with a t(15;22) translocation. *J Pathol*. 4:434-7.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. (2008) Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*. 7:2125-37.
- Naito N, Kawai A, Ouchida M, Dan`ura T, Morimoto Y, Ozaki T, Shimizu K, Inoue H. (2000) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in the diagnosis of soft tissue sarcomas. *Cancer*. 9:1992-8.

- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Iwamoto Y. (2003) Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem.* 17:15105-15.
- Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, Hayes M, Clarkson PW, Winstanley M, Sorensen PH, Nielsen TO, Horsman DE. (2007) Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *J Mol Diagn.* 4:459-63.
- Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, Irifune H, Zembutsu H, Tanaka T, Aoyama T, Hosaka T, Kawaguchi S, Wada T, Hata J, Toguchida J, Nakamura Y, Tokino T. (2002) The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene.* 54:8302-9.
- Nozawa S, Ohno T, Banno Y, Dohjima T, Wakahara K, Fan DG, Shimizu K. (2005) Inhibition of platelet-derived growth factor-induced cell growth signaling by a short interfering RNA for EWS-Fli1 via down-regulation of phospholipase D2 in Ewing sarcoma cells. *J Biol Chem.* 30:27544-51.
- Ohali A, Avigad S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Gelernter I, Goshen Y, Yaniv I, Zaizov R. (2003) Association between telomerase activity and outcome in patients with nonmetastatic Ewing family of tumors. *J Clin Oncol.* 20:3836-43.
- Ohno T, Rao VN, Reddy ES. (1993) EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res.* 24:5859-63.
- Oikawa T, Yamada T. (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene.* 303:11-34.
- Olsen RJ, Hinrichs SH. (2001) Phosphorylation of the EWS IQ domain regulates transcriptional activity of the EWS/ATF1 and EWS/FLI1 fusion proteins. *Oncogene.* 14:1756-64.
- O'Sullivan MJ, Perlman EJ, Furman J, Humphrey PA, Dehner LP, Pfeifer JD. (2001) Visceral primitive peripheral neuroectodermal tumors: a clinicopathologic and molecular study. *Hum Pathol.* 10:1109-15.
- Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. (1995) Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene.* 6:1049-54.

- Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. (2008) EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS One*. 4:e1965.
- Ozaki T, Paulussen M, Poremba C, Brinkschmidt C, Rerim J, Ahrens S, Hoffmann C, Hillmann A, Wai D, Schaefer KL, Boecker W, Juergens H, Winkelmann W, Dockhorn-Dworniczak B. (2001) Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2:164-71.
- Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli M, Zangrilli D, Mencarelli A, Diverio D, Biondi A, Lo Coco F, Rambaldi A, Grignani F, Rochette-Egly C, Gaube MP, Chambon P, Pelicci PG. (1992) Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 4:1397-407.
- Park YK, Chi SG, Park HR, Yang MH, Unni KK. (1998) Detection of t(11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma in paraffin embedded tissue by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Korean Med Sci*. 4:395-9.
- Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O. (1997) A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene*. 10:1159-64.
- Peter M, Gilbert E, Delattre O. (2001) A multiplex real-time pcr assay for the detection of gene fusions observed in solid tumors. *Lab Invest*. 6:905-12.
- Pereira R, Quang CT, Lesault I, Dolznig H, Beug H, Ghysdael J. (1999) FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene*. 8:1597-608.
- Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. (1993) Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. *Genomics*. 3:609-15.
- Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol*. 16:7275-83.

- Qian X, Jin L, Shearer BM, Ketterling RP, Jalal SM, Lloyd RV. (2005) Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 1:23-8.
- Quezado M, Benjamin DR, Tsokos M. (1997) EWS/FLI-1 fusion transcripts in three peripheral primitive neuroectodermal tumors of the kidney. *Hum Pathol.* 7:767-71.
- Rao VN, Ohno T, Prasad DD, Bhattacharya G, Reddy ES. (1993) Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene.* 8:2167-73.
- Reubi JC, Koefoed P, Hansen TO, Stauffer E, Rauch D, Nielsen FC, Rehfeld JF. (2004) Procholecystinin as marker of human Ewing sarcomas. *Clin Cancer Res.* 16:5523-30.
- Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rössler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Löwel D, von Luettichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Müller-Tidow C, Burdach S. (2009) EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuroectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13:5324-9.
- Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, Stamenkovic I. (2005) Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 24:11459-68.
- Riggi N, Stamenkovic I. (2007) The Biology of Ewing sarcoma, *Cancer Letters.* 28:254:1-10.
- Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I. (2008) EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 7:2176-85.
- Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, Scotlandi K. (2010) CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest.* 3:668-80.

- Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE. (2004) The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 4:1266-77.
- Rossow KL, Janknecht R. (2001) The Ewing's sarcoma gene product functions as a transcriptional activator. *Cancer Res.* 6:2690-5.
- Roy M, Xu Q, Lee C. (2005) Evidence that public database records for many cancer-associated genes reflect a splice form found in tumors and lack normal splice forms. *Nucleic Acids Res.* 16:5026-33.
- Sandberg AA, Bridge JA. (2000) Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1:1-26.
- Savola S, Klami A, Tripathi A, Niini T, Serra M, Picci P, Kaski S, Zambelli D, Scotlandi K, Knuutila S. (2009) Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. *BMC Cancer.* 9:17.
- Scotlandi K, Serra M, Manara MC, Benini S, Sarti M, Maurici D, Lollini PL, Picci P, Bertoni F, Baldini N. (1996) Immunostaining of the p30/32MIC2 antigen and molecular detection of EWS rearrangements for the diagnosis of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. *Hum Pathol.* 4:408-16.
- Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, Serra M, Manara MC, Picci P, Baldini N. (1998) Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res.* 18:4127-31.
- Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, Tillman RM, Ramani P, Cullinane C, Coleman N. (2003) FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res.* 15:4568-76.
- Siligan C, Ban J, Bachmaier R, Spahn L, Kreppel M, Schaefer KL, Poremba C, Aryee DN, Kovar H. (2005) EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene.* 15:2512-24.
- Skotheim RI, Nees M. (2007) Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int J Biochem Cell Biol.* 7-8:1432-49.

- Skotheim RI, Thomassen GO, Eken M, Lind GE, Micci F, Ribeiro FR, Cerveira N, Teixeira MR, Heim S, Rognes T, Lothe RA. (2009) A universal assay for detection of oncogenic fusion transcripts by oligo microarray analysis. *Mol Cancer*. 8:5.
- Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR, Lessnick SL. (2006) Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*. 5:405-16.
- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. (1994) A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet*. 2:146-51.
- Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, Rowland JM, Biggs CA, Thomas G, Triche TJ. (1993) Reverse transcriptase PCR amplification of EWS/FLI-1 fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol*. 3:147-57.
- Sotillo-Piñeiro E, Sierrasesúmaga L, Patiño-García A. (2004) Telomerase activity and telomere length in primary and metastatic tumors from pediatric bone cancer patients. *Pediatr Res*. 2:231-5.
- Stegmaier S, Leuschner I, Aakcha-Rudel E, Münch P, Kazanowska B, Bekassy A, Treuner J, Koscielniak E. (2004) Identification of various exon combinations of the *ews/fli1* translocation: an optimized RT-PCR method for paraffin embedded tissue -- a report by the CWS-study group. *Klin Padiatr*. 6:315-22.
- Sumegi J, Nishio J, Nelson M, Frayer RW, Perry D, Bridge JA. (2011) A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Mod Pathol*. 3:333-42.
- Szuhai K, Ijszenga M, de Jong D, Karseladze A, Tanke HJ, Hogendoorn PC. (2009) The NFATc2 gene is involved in a novel cloned translocation in a Ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clin Cancer Res*. 7:2259-68.
- Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kyo S, Ohno T, Taira T, Ariga H, Nakajima K, Hatta M, Kobayashi M, Sano H, Kohgo T, Shindoh M. (2003) EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res*. 23:8338-44.

- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. (1997) EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest.* 2:239-47.
- Terrier-Lacombe MJ, Guillou L, Chibon F, Gallagher G, Benhattar J, Terrier P, Ranchère D, Coindre JM. (2009) Superficial primitive Ewing's sarcoma: a clinicopathologic and molecular cytogenetic analysis of 14 cases. *Mod Pathol.* 1:87-94.
- Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeil S, Marrano P, Bayani J, Malkin D, Greenberg M, Lorenzana A, Zielenska M. (1996) Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? A report of four cases showing this transcript in a wider range of tumor types. *Am J Pathol.* 4:1125-38.
- Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llorca A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. (2006) Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res.* 20:9937-47.
- Toretzky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK. (1997) Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol.* 1-2:9-16.
- Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. (1983) Chromosomal translocation in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med.* 309: 497-498.
- Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata J. (1996) A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extrasosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2:608-12.
- van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, Lessnick SL, Marina N, Triche TJ, Spoto R, Womer RB, Lawlor ER. (2010) Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 12:1989-94.
- Venables JP. (2006) Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays.* 4:378-86.

- Wang L, Bhargava R, Zheng T, Wexler L, Collins MH, Roulston D, Ladanyi M. (2007) Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. *J Mol Diagn.* 4:498-509.
- Wang WL, Mayordomo E, Zhang W, Hernandez VS, Tuvín D, Garcia L, Lev DC, Lazar AJ, López-Terrada D. (2009) Detection and characterization of EWSR1/ATF1 and EWSR1/CREB1 chimeric transcripts in clear cell sarcoma (melanoma of soft parts). *Mod Pathol.* 9:1201-9.
- Wei G, Antonescu CR, de Alava E, Leung D, Huvos AG, Meyers PA, Healey JH, Ladanyi M. (2000) Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer.* 4:793-9.
- Welford SM, Hebert SP, Deneen B, Arvand A, Denny CT. (2001) DNA binding domain-independent pathways are involved in EWS/FLI1-mediated oncogenesis. *J Biol Chem.* 45:41977-84.
- Yang K, Lui WO, Xie Y, Zhang A, Skytting B, Mandahl N, Larsson C, Larsson O. (2002) Co-existence of SYT-SSX1 and SYT-SSX2 fusions in synovial sarcomas. *Oncogene.* 26:4181-90.
- Yoshino N, Kojima T, Asami S, Motohashi S, Yoshida Y, Chin M, Shichino H, Yoshida Y, Nemoto N, Kaneko M, Mugishima H, Suzuki T. (2003) Diagnostic significance and clinical applications of chimeric genes in Ewing's sarcoma. *Biol Pharm Bull.* 5:585-8.
- Zhang D, Paley AJ, Childs G. (1998) The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. *J Biol Chem.* 29:18086-91.
- Zoubek A, Pfeleiderer C, Salzer-Kuntschik M, Amann G, Windhager R, Fink FM, Koscielniak E, Delattre O, Strehl S, Ambros PF, Gadner H, Kovar H. (1994) Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. *Br J Cancer.* 70:908-13.
- Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jürgens H, Gadner H, Kovar H. (1996) Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol.* 4:1245-51.

- Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Plougastel B, Joubert I, Melot T, Peter M, De Jong P, Rouleau G, Aurias A. (1992) Cloning and characterization of the Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocation breakpoints. *Genes Chromosomes Cancer*. 4:271-7.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C. (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J*. 12:4481-7.
- Zucman-Rossi J, Legoux P, Victor JM, Lopez B, Thomas G. (1998) Chromosome translocation based on illegitimate recombination in human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11786–91.
- Zwerner JP, May WA. (2002) Dominant negative PDGF-C inhibits growth of Ewing family tumor cell lines. *Oncogene*. 24:3847-54.
- Zwerner JP, May WA. (2001) PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene*. 5:626-33.

12. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Patócs B, Németh K, Garami M, Arató G, Kovalszky I, Szendrői M, Fekete G. Multiple splice variants of EWSR1-ETS fusion transcripts co-existing in the Ewing sarcoma family of tumors. *Cell Oncol.* 2013;3:191-200. **IF (2011): 3,105**

Patócs B, Németh K, Garami M, Arató G, Kovalszky I, Szendrői M, Fekete G. Utilisation of fluorescent multiplex PCR and laser-induced capillary electrophoresis for the diagnosis of Ewing family of tumours in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Clin Pathol.* 2012;12:1112-8. **IF (2011): 2,306**

13. Köszönetnyilvánítás

El ször is szeretném megköszönni Fekete György Professzor Úrnak, amiért a PhD-hallgatója lehettem, amiért lehet vé tette számomra, hogy a II. számú Gyermekgyógyászati Klinika Molekuláris Genetikai Laborjában dolgozhattam, amiért évekig bátorított és támogatott munkámban, és amiért elhúzódó tanulmányaim közepette is bízott bennem. Figyelme és támogatása többször is átsegített a nehezebb id szakokon.

Köszönet illeti Dr. Garami Miklóst a témakeresésben és a kutatás szervezésében nyújtott pótolhatatlan segítségért, valamint segít készségéért és ötleteiért, melyekkel mindig tudott kiutat mutatni, ha megakadtam a kutatómunkámban.

Hálásan köszönöm Dr. Németh Krisztinának és Staub Krisztinának, amiért befogadtak a Molekuláris Genetikai Laborba, megosztották velem tapasztalataikat, minden lehetséges téren segítették munkámat, és együtt éreztek velem jóban-rosszban.

Köszönettel tartozom Szendr i Miklós Professzor Úrnak, amiért diagnosztikus céllal rendelkezésemre bocsátotta az Ortopédiai Klinika Tumorbankjának állományában található frissen fagyasztott és paraffinba ágyazott mintáit.

Köszönöm Kovalszky Ilona Professzor Asszonynak, és az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztikai Labor munkatársainak, hogy bevezettek az RNS-izolálás és RT-PCR rejtelseibe. Külön köszönöm Dr. Füle Tibornak az EFT molekuláris diagnosztikai módszerének els változatához f zött értékes ötleteit, tanácsait.

Sápi Zoltán Professzor Úrnak köszönöm a munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati segítséget.

Köszönet illeti Dr. Arató Gabriellát és Truszka Mónikát a kutatás elindításában nyújtott segítségükért és tanácsaikért.

Szeretném megköszönni Vincze Zsoltné Miriamnak a paraffinos metszetek és a frissen fagyasztott minták el keresésében nyújtott fáradhatatlan segítségét.

Köszönöm Dr. Jakab Zsuzsannának, amiért rendelkezésemre bocsátotta a II. Gyermekklinika Tumorregiszterének adatait.

Hálás köszönettel tartozom Schuler Dezs Professzor Úrnak a témaválasztásban nyújtott segítségéért, és az elkészült cikkek mélyreható szakmai lektorálásáért.

Végezetül ez a munka nem készülhetett volna el szüleim, férjem szülei, de legfőképpen férjem és gyermekeim támogatása nélkül. Az szeretetük, türelmük és segítségük adott erőt ahhoz, hogy mindig előre nézzek, és egy újabb, értékes tapasztalatokkal teli korszakot zárhassak le az életemből.