SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2597.

KISZNER GERGŐ

Onkológia
című program

Programvezető: Dr. Tímár József, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Krenács Tibor, kutatóprofesszor

In situ sejtciklus analízis és connexin expresszió tanulmányozása melanocytás daganatok progressziója során

Doktori értekezés

Dr. Kiszner Gergő

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Krenács Tibor, D.Sc., kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Csonka Tamás, Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Nardainé Dr. Imrédi Eleonóra, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Tóth Erika, Ph.D., főorvos
Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

1 Rövidítések jegyzéke 5

2 Bevezetés 9

2.1 Melanocyták szerepe - melanoszóma, melanin 9

2.2 A melanocyták fejlődéstana és működése 9

2.3 A napsugárzás hatásai 11

2.4 Benignus melanocytás daganatok 12

2.4.1 Benignus melanocytás naevus 12

2.4.2 Dysplasticus naevus 12

2.5 Malignus melanoma 14

2.5.1 A melanoma incidenciája 14

2.5.2 Molekuláris genetikai elváltozások melanomában 16

2.5.3 A melanoma onkogenezise, klinikai/szövettani altípusai 20

2.5.4 A melanoma prognosztikus faktorai 21

2.5.5 A melanoma kezelése 22

2.5.6 A melanoma differenciáldiagnosztikája 23

2.6 A sejtciklus 25

2.6.1 A sejtciklus-progresszió szabályozása 25

2.6.2 DNS-replikáció engedélyezés, represszió és a DNS-tranzakciók szabályozása 28

2.7 Connexinek és direkt sejtkommunikációs csatornáik 29

2.7.1 A connexin csatornák felépítése és altípusai 29

2.7.2 A connexin csatornák képződése 32

2.7.3 A connexin csatornák molekulatranszportjának szabályozása 33

2.7.4 Connexin félcsatornák, csatornafüggetlen funkciók 34

2.7.5 Connexin mutációk következményei 34

2.7.6 „Bystander” hatás közvetítése szomszédos sejtekbe 36
2.7.7 Deregulált connexin csatornák lehetséges szerepe daganatokban.....36
2.7.8 Connexin csatornák az epidermisben és melanomában 38
2.8 A sejtciklus és connexinek kapcsolata 39
2.8.1 Növekedési útvonalak és connexinek kapcsolata 39
2.8.2 Setciklisszabályozók és connexinek kapcsolata 40
3 Célkitűzések 42
4 Módszerek 43
4.1 Connexin izotípusok expressziójának in silico analízise melanocytákban és melanocytás neoplasiákban 43
4.2 Melanoma sejtvonalak és melanocyta kultúrák 44
4.3 RNS-izolálás, cDNS-átírás, valós idejű PCR 45
4.4 Festéktranszfer-analízis 47
4.5 Melanocytás bőrelváltozások szövetmintái, szöveti multiblokk 48
4.6 Immunhisztokémia és immuncitokémia 50
5 Eredmények 54
5.1 Sejtciklusfázisok progressziója melanocytás daganatokban..... 54
5.2 Melanocytás daganatok klaszteranalízise sejtciklus-fázismarkerek expressziója alapján..... 58
5.3 A sejtciklusmarkerek elkülönítik a dysplasticus naevusokat a vékony melanomáktól 59
5.4 In silico connexin génexpresszió analízis 60
5.5 Connexin génexpresszió tenyésztett primer melanocytákban és melanoma sejtvonalakban 62
5.6 Connexin fehérje-izotípusok in situ detektálása melanocytákban és melanocytás daganatokban 64
5.7 Sejtciklus-szabályozó és connexin fehérjék expressziójának összehasonlítása68

5.8 A „gap junction” kommunikáció festéktranszfer analízise 69

5.9 Connexin expresszió a tumor mikrokörnyezetben 70

6 Megbeszélés 73

6.1 A sejtciklus immunhisztokémiai vizsgálata melanocytás daganatokban, különös tekintettel a vékony melanomák és dysplasticus naevusok elkülöníthetőségére 73

6.2 Connexinek változó expressziójának vizsgálata melanocytás daganatok progressziója során 77

7 Következtetések, új megfigyelések 84

8 Összefoglalás 86

9 Summary 87

10 Irodalomjegyzék 88

11 Saját publikációk jegyzéke 120

11.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények 120

11.2 A disszertációtól független közlemények 120

12 Köszönetnyilvánítás 122

1 Rövidítések jegyzéke

Azokat a rövidítéseket tüntettem fel, melyek a dolgozat szövegének több bekezdésében is előfordulnak.

ABCD-szabály	A - aszimmetria, B - határvonal, C - szín, D - átmérő > 6 mm vagy különféle egyéb struktúrák
ACTB	β-actin gén
α-MSH	alfa melanocyta-stimuláló hormon
ARF	„alternate reading frame”
ATP	adenozin-trifoszfát
Axin	„axis inhibition protein”
BSA	szarvasmarhaszérum-albumin („bovine serum albumin”)
calcein-AM	calcein-acetoximetilészter
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
CCND1	cyclin D1 gén
CDC	„cell division cycle”
CDK	cyclin-dependens kináz
CDKN2A	cyclin-dependens kináz inhibitor 2A
cDNS	komplementer DNS
CHK	„checkpoint kinase”
CIP/KIP	„CDK interacting protein/kinase inhibitory protein”
CL	intracelluláris hurok
CN	közönséges naevus („common nevus”)
Col17a	kollagén XVII, BP180

CSD	krónikus napfénykárosodással összefüggő („chronically sun-damaged”)
cT	„cycle threshold”
CT	C-terminális domén
Cx	connexin
DiI	1,1’-dioktadecil-3,3,3’,3’-tetrametilindokarbocianin-perklorát
Dkk	Dickkopf-fehérjék
DN	dysplasticus naevus
DNS	dezoxiribonukleinsav
DP	„dimerization partner”
E	1.) extracelluláris hurok; 2.) glutaminsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
E2F	„adenovirus early gene E2 promoter binding factor”
EMT	epithelialis-mesenchymalis transitio
ERK	„extracellular signal-regulated kinase”
FBS	magzati borjúszérum („fetal bovine serum”)
GEO	Gene Expression Omnibus
GJ	réskapcsolat („gap junction”)
GSK3β	„glycogen synthase kinase 3β”
GTP	guanozin-trifoszfát
INK4	„inhibitor of CDK4”
KitL	Kit-ligand
LogFC	„log-fold-change”
M	transzmembrán szakasz

MAPK	mitogén-aktivált proteinkináz
MC1R	melanocortin-1 receptor
MCM	„minichromosome maintenance protein”
MDM	„murine double minute”
MEK	„MAPK/ERK kinase”
MITF	microphthalmia-asszociált transzkripciós faktor
MMet	áttéti melanoma
MMP	mátrix-metalloproteáz
mRNS	„messenger” RNS
Myc	myelocytomatosis
NF1	neurofibromin 1
NIH	Nemzeti Egészségügyi Intézet („National Institutes of Health”)
NRAS	neuroblastoma + RAS
NT	N-terminális domén
Pax	„paired box”
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat („phosphate-buffered saline”)
PCR	polimeráz láncreakció („polymerase chain reaction”)
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PIP2	foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfát
PIP3	foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát
PM	primer melanoma
PRAME	„preferentially expressed antigen in melanoma”
PTEN	„phosphatase and tensin homolog”

qRT-PCR	valós idejű reverz transzkripciós PCR („real-time quantitative reverse transcription PCR”)
RAF	„rapidly accelerated fibrosarcoma”
RAS	„rat sarcoma”
RB	retinoblastoma
RNS	ribonukleinsav
RQ	„relative quotient”
SD	standard deviáció
Src	sarcoma
SSM	felszínesen terjedő melanoma („superficial spreading melanoma”)
SWI/SNF	„switch/sucrose non-fermentable”
TBS	trisz-pufferelt sóoldat („tris-buffered saline”)
TBST	Tween-20-at tartalmazó TBS
TE	trisz-EDTA
TERT	telomeráz reverz transzkriptáz
TGF	transzformáló növekedési faktor („transforming growth factor”)
Top2a	topoizomeráz II alfa
TP53	tumor protein 53 gén
USA	Amerikai Egyesült Államok
UV	ultraviola, ibolyán túli
V	valin
WAF	„wild-type p53-activated fragment-1”
Wnt	„wingless” + Int1

2 Bevezetés

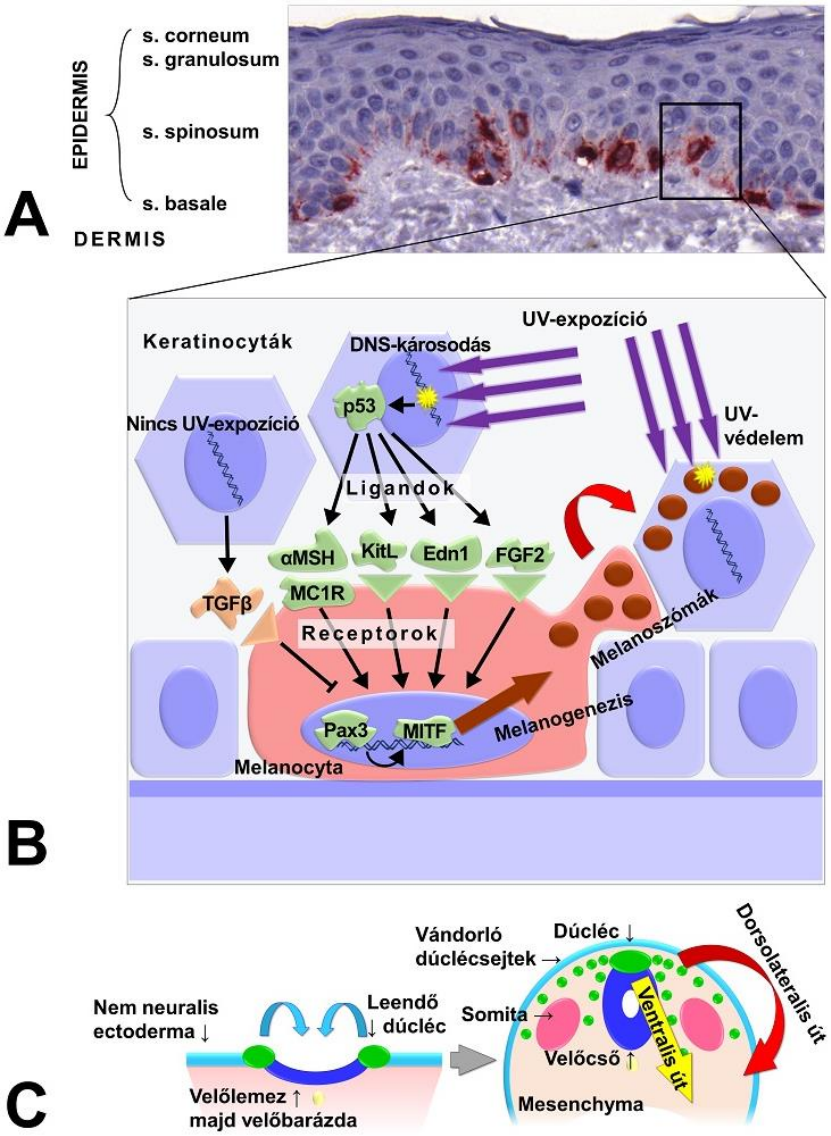
Melanomában (melanoma malignum) évente százezrek betegszenek meg és tízezrek hunynak el világszerte, a betegség incidenciája pedig, a primer daganat szembeötlő lokalizációja és a kiterjedt szűrővizsgálatok ellenére folyamatosan emelkedik (1). A bőrben lévő melanocyták rosszindulatú daganatának patogenezisében az ibolyántúli (ultraviola, UV) sugárzás játszik kulcsszerepet – éppen az a környezeti faktor, melynek káros hatásait e sejtek lennének hivatottak kivédeni, az általuk termelt melanin pigmentek fényabszorpciós hatását kihasználva.

2.1 Melanocyták szerepe - melanoszóma, melanin

Az emberi bőr bazális sejtrétege négyzetmilliméterenként 900–1500 darab, összesen mintegy 3 milliárd melanocytát tartalmaz (2, 3) (**1/A. ábra**). Az általuk termelt melaninok a melanoszómáknak nevezett intracelluláris vezikulumokban képződnek, majd ezután ezrével transzportálódnak a kültakaró hámsejtjeibe. A keratinocyták sejtmagvai körül felgyülemlő, melanoszómákba zárt melanin védi a genetikai állományt a mutagén hatású UV-sugárzástól, annak nagy részét hővé alakítva át (**1/B. ábra**).

2.2 A melanocyták fejlődéstana és működése

Gerincesekben a melanocyták dúcléc eredetű sejtek (4) (**1/C. ábra**). A dúcléc („neural crest”, crista neuralis) embrionális, multipotens sejtpopuláció, mely a hagyományos nézet szerint az ectodermából alakul ki, a velőlemez („neural plate”) és a nem-neuralis ectoderma határán („neural plate border”) (5, 6). A dúclécsejtek vándorlása és differenciálódása során egyaránt kialakulnak ectodermalis derivátumok (melanocyták, perifériás idegsejtek, gliasejtek, mellékvesevelősejtek), de ectomesenchymalis sejtek is (porc, csont és zsír a feji régióban). A melanoblastok emlősökben a dorsolateralis útvonalon, a somiták mögött haladnak az ectodermából fejlődő epidermis (felhám) felé, miközben proliferációjuk is zajlik, míg az idegsejtekké és gliákká alakuló neurogén sejtek a ventralis útvonalon vándorolnak. Azonban az idegek mentén haladó Schwann-sejt prekurzorok ugyancsak képesek melanocytákká differenciálódni (7). Az epidermist elérő melanoblastok intenzívebb proliferációba kezdenek és differenciálódnak, a kolonizáció során a Kit tirozinkináz jelútvonal aktív.



1. ábra. A: Mikroszkópos felvétel az emberi bőr rétegeiről (hematoxilin festés), melan A immunjelöléssel hyperplasiás melanocyták látszanak (piros). **B:** A melanocyták funkciója. UV-expozíció hiányában a keratinocyták (kék) TGF-β-t szekretálnak, melyek a melanocyták melanogenezisét (barna) gátolják. UV-károsodás (lila) hatására a felhámsejtekben a p53 aktiválódik, mely olyan fehérjék szekrécióját serkenti (pl. α-MSH, KitL, endothelin 1 - Edn1, fibroblast növekedési faktor 2 - FGF2), melyek a melanocyták plazmamembrán-receptoraihoz (zöld háromszögek) kötődve melanintermelést indukálnak. A melanogenezis fő transzkripciós faktora a MITF, melynek átírását pl. a Pax3 transzkripciós faktor serkenti. A melanintartalmú melanoszómák (barna körök) a környező keratinocytákba transzportálódnak, ahol védik a sejtmagot az UV-okozta károsodástól. **C:** Az embrionális fejlődés során a dúclécsejtek (zöld) a velőlemez (sötétkék) és a nem neuralis ectoderma (világoskék) határán alakulnak ki, majd a mesenchymában (rózsaszín) vándorolnak a célszervekbe. A melanoblastok a somiták (bíbor) mögött, a dorsolateralis úton (piros) vándorolnak a bőrbe, míg a neurogén sejtek a ventralis úton (sárga), a somiták előtt haladnak. Vandamme és Berx közleménye alapján (6).

UV-sugárzás hatására a bőr keratinocytáiban a p53 aktiválódik, ami e sejtek által termelt ligandok (pl. alfa melanocyta-stimuláló hormon - α-MSH, Kit-ligand - KitL) révén a melonocytákban a Kit és melanocortin-1 receptor (MC1R) útvonalak aktivizálódásához vezet, amely a microphthalmia-asszociált transzkripciós faktor (MITF) működését indítja el, melanintermeléshez és fokozódó melanoszóma-forgalomhoz vezetve (6) (**1/B. ábra**). Sugárzásnak ki nem tett bőrterületen a keratinocyták transzformáló növekedési faktor-bétát („transforming growth factor", TGF) szekretálnak, ami a melanocytákban foszfo-Smad2/3 (Smad: Sma + „mothers against decapentaplegic" - MAD) általi Pax3-gátláshoz vezet (Pax: „paired box"), s ez blokkolja a melanintermelést. A TGF-β a sejtproliferációt is visszafogja, a $p15^{INK4b}$ (INK4: „inhibitor of CDK4", CDK: cyclin-dependens kináz) fehérje közvetítésével blokkolva a CDK4/6 működését (8).

2.3 A napsugárzás hatásai

A Napból a Földre érkező elektromágneses sugárzás energiájának legnagyobb részét a látható fény és az infravörös tartomány teszi ki, csupán csekély hányada a kis hullámhosszú Röntgen- és UV-sugárzás, valamint a nagyobb hullámhosszú rádióhullám (9-11). A légkörben a napsugárzás kb. 20%-a nyelődik el; a földfelszínt elérő UV-tartomány 95%-a UVA (320–400 nm), 4-5%-a UVB tartományú. Az emberi bőrben az UVB az epidermisnél mélyebbre nem terjed, az UVA a dermis (irha) aljáig eljut. Az UVB felelős a D-vitamin szintéziséért, a késleltetett napbarnulásért („delayed tanning", melanogenezis), de a napégésért (erythema) és karcinogenezisért is.

Az UV-sugárzás káros hatásaiért egyrészt a közvetlen dezoxiribonukleinsav (DNS)-károsítás (szomszédos pirimidinek között létrejövő kovalens kötések (12)), másrészt az oxidatív stressz felel, valamint az ezek következtében létrejött gyulladásos reakciók. A tartós, nem szándékos napfényhatás („non-intentional sun exposure" - pl. kültéri munka) elsősorban a laphámrák, míg az időszakos, szándékos és intenzív UV-expozíció („intentional sun exposure": napozás és szoláriumhasználat) elsősorban a melanoma kockázatát növeli, a basaliomáét pedig mindkettő (13-15). A két hám eredetű daganatot összehasonlítva a fehérek és ázsiaiak körében a basalioma, míg a feketék és indiaiak között a laphámrák a relatíve gyakoribb (16). A fehér bőrszín 70-szeres bőrrákkockázattal jár a feketéhez viszonyítva (17).

2.4 Benignus melanocytás daganatok

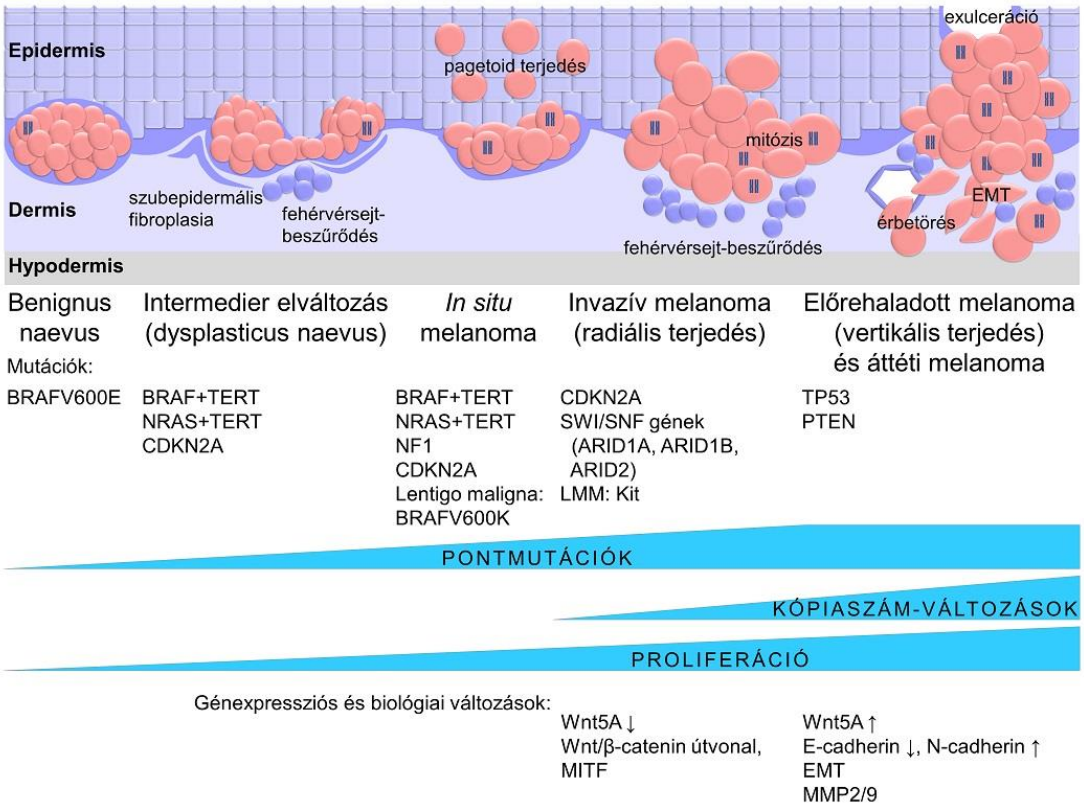
2.4.1 Benignus melanocytás naevus

A festéksejtes anyajegyek (naevus pigmentosus) melanocyta eredetű benignus daganatok (18, 19). Rendkívül gyakoriak; a kaukázusi rasszba tartozó emberek bőrén átlagosan 15–30 közönséges szerzett festéksejtes anyajegy fejlődik ki, míg más rasszoknál 10 vagy kevesebb (20, 21). A közönséges naevusok általában 4 mm-nél kisebb, jól körülhatárolt bőrelváltozások. Az epidermisre korlátozódó forma a junkcionális naevus, ami tovább növekedve a dermis felé terjed, ekkor „compound" (= kevert) naevusról beszélünk. Az intradermális naevus már csak az irhát érinti, majd az évek során a tumor regrediál. A naevusok nagyobb száma, mérete és atípusos elhelyezkedése fokozza a melanoma malignum kialakulásának kockázatát (22, 23). A benignus naevusok nagy része $BRAF^{V600E}$ aminosavcserét okozó mutációt hordoz (RAF: „rapidly accelerated fibrosarcoma"; V: valin; E: glutaminsav), s ezek krónikus napfénykárosodással össze nem függő („non chronically sun-damaged", non-CSD) melanomákká fajulhatnak el (3) (**2. ábra**). A $BRAF^{V600E}$ mutáció a mitogén-aktivált proteinkináz (MAPK) útvonalat aktiválja, és önmagában elégséges a naevus létrejöttéhez (24, 25). A kórosan aktív növekedési jel a melanocyták korlátozott mértékű proliferációját, majd a sejtosztódás teljes, átmeneti leállását eredményezi, így azok megöregedett sejtekre emlékeztetnek (senescencia-szerű állapot), azonban pl. UV-sugárzás, inkomplett eltávolítási kísérlet vagy immunszuppresszió hatására képesek újra osztódni (26).

2.4.2 Dysplasticus naevus

A sporadikusan előforduló dysplasticus naevus incidenciája a kaukázusi populációkban becslések szerint 2–8% (27). Dermatoszkópos vizsgálattal (ABCD-szabály: A - aszimmetria, B - határvonal, C - szín, D - átmérő > 6 mm vagy különféle egyéb struktúrák) többségük az egyértelműen benignus naevusok és a malignus melanomák között képeznek átmenetet (28, 29) (**2. ábra**). Az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet („National Institutes of Health", NIH) 1992-es ajánlása szerint az atípusos naevus kritériumai: 1.) architekturális rendellenesség aszimmetriával, 2.) szubepidermális fibroplasia, 3.) lentiginosus melanocyta-hyperplasia, eltérő méretű, orsósejtekből vagy epitheloid sejtekből álló sejtfészkekkel, melyek hidakat képeznek a szomszédos

hámbehúzódások között (30). Néhány intraepidermális melanocyta és ezek fészkei jellemző módon túlterjednek a fő dermális elváltozáson. A vererek körül és a dermális kötőszövetben gyakran figyelhető meg lymphocyta- és histiocyta infiltráció is. A naevussejtek atípiája nem mindig mutatható ki. 1993-ban az Európai Rákkutatási és



2. ábra. A melanoma progressziós modellje, Shain és mtsai., Prasad és mtsai., valamint Bertolotto közleményei alapján (25, 52, 54). A non-CSD melanomák *de novo* vagy megelőző naevus talaján fejlődnek ki. A közönséges naevusok tipikusan $BRAF^{V600E}$ mutációt hordoznak, míg a dysplasticusok eltérő károsodásokat is szerezhetnek (pl. egyéb BRAF, NRAS, TERT mutációk, egy allélt érintő CDKN2A eltérések). Mivel a dysplasticus naevus és az *in situ* melanoma közötti átmenet gyakran bizonytalanul határozható meg, így Shain és mtsai az intermedier elváltozás megnevezést javasolják. Az *in situ* melanomák genetikai károsodásai az intermedier elváltozásokéhoz hasonlók, valamint az NF1 funkcióvesztő mutációját is megfigyelték. Invazív melanomában a fentieken kívül a CDKN2A két allélt érintő funkcióvesztő mutációja és a SWI/SNF kromoszóma-remodelláló gének károsodása is jellemző, a progresszió során pedig a TP53 és PTEN gének funkcióvesztése jelentkezik. A betegség előrehaladtával a genetikai károsodások felhalmozódnak, és a sejtproliferáció is intenzívebbé válik. Az invazív melanoma progressziójának kulcsfontosságú eseménye a radiális terjedést felváltó vertikális növekedés. Előbbit alacsony Wnt5A expresszió és a kanonikus Wnt/β-catenin jelút aktivitása jellemzi, míg az utóbbiban a Wnt5A expressziója és hatása fokozódik, az E-cadherint háttérbe szorítja az N-cadherin, EMT történik, és a mikrokörnyezet lebontását MMP-k segítik. CSD melanoma esetén nincs megelőző benignus elváltozás. Az *in situ* lentigo maligna, típusosan BRAF non-V600E mutációt hordoz, míg az invazív lentigo maligna melanomában gyakori az aktiváló Kit-mutáció is.

Rákkezelési Szervezet („European Organisation for Research and Treatment of Cancer”) Malignus Melanoma Együttműködési Csoportja más kritériumokat nevezett meg: 1.) melanocyták, valamint ezek változó alakú sejtfészkeinek intraepidermális proliferációja, az egyes fészkek között gyakran hidakat is képezve, 2.) egyes melanocyták nagy, változóan pleomorf maggal bírnak, 3.) lympho-histiocytás infiltráció az epidermisben. A diagnózishoz a három felsorolt kritérium közül legalább kettőnek a jelenléte szükséges (31). A dysplasticus naevusok nem közönséges naevusokból, hanem *de novo* alakulnak ki, vezető mutációik is eltérhetnek, a mutációs terhelés („mutation burden”) magasabb, mint közönséges naevusok esetében (3) (**2. ábra**). Sporadikus formában az NRAS (N: neuroblastoma, Ras: „rat sarcoma”) és a BRAF mutációi gyakoriak (25). Az érintett személyeknél közel négyszer nagyobb a melanoma kifejlődésének rizikója, és a dysplasticus naevusok számának növekedésével ez még magasabb lehet (32, 33).

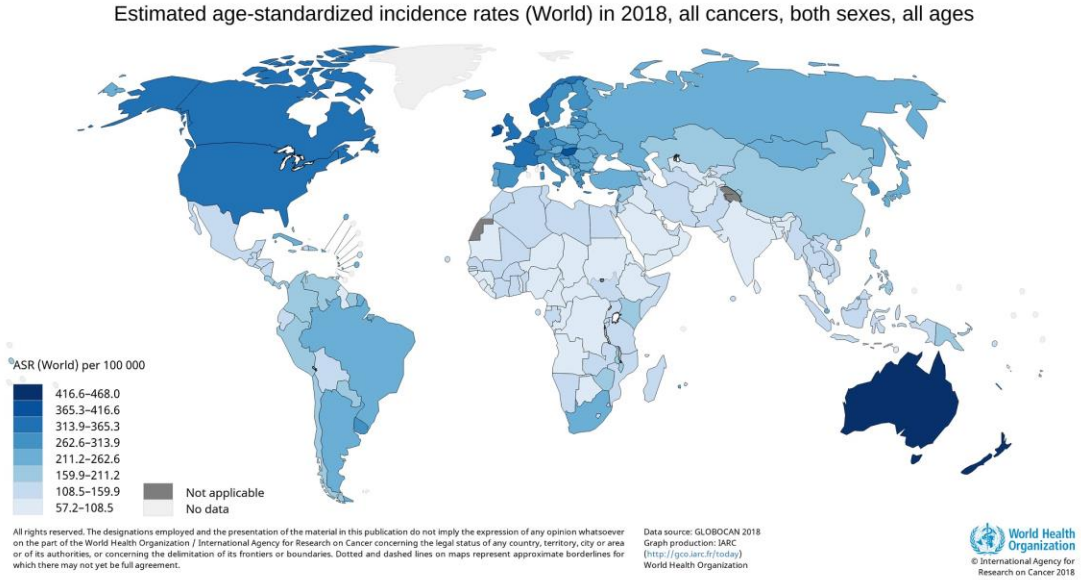
A familiárisan halmozódó dysplasticus naevus szindróma olyan csírasejtes mutációkkal társul, melyek a melanoma magas penetranciáját is okozzák, a TERT (telomeráz reverz transzkriptáz) promotert és a CDKN2A (cyclin-dependens kináz inhibitor 2A) gént is érinthetik (3, 25, 34, 35).

2.5 Malignus melanoma

A melanoma malignum melanocyta eredetű rosszindulatú daganat, mely az esetek több mint 95%-ában a bőrön alakul ki (14, 18).

2.5.1 A melanoma incidenciája

Napjainkban, a föld közel nyolcmilliárd fős népességében (36) évente közel háromszázezer új melanomás beteggel kell számolni, életkorra standardizálva („age-standardized rate”, ASR) 3,1/100000 fővel, azonban incidenciája folyamatosan növekszik (37). Előfordulása a javarészt világos bőrű, Európa északi részéről származó, és a déli ózonlyukhoz közel fekvő Ausztráliában a legmagasabb (38), ahol az ASR incidencia 40,3 illetve 30,5/100000 fő (férfiak ill. nők esetében), de Észak-Amerikában (16,1 ill. 12,2) és Európában (8,6 ill. 8,9) is jelentős. Dél-Amerikában ennél alacsonyabb (2,9 ill. 2,2), míg Afrikában (1,0 ill. 1,1) és Ázsiában (0,5 ill. 0,4) a legalacsonyabb (39) (**3. ábra**). Európán belül Svájcban (19,2) és az északi országokban (14,0 ill. 15,4)



3. ábra. A melanoma ASR incidenciája a Föld országaiban. Forrás: Ferlay et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. https://gco.iarc.fr/today/ online-analysis-map , elérve: 2020.09.09. IARC/WHO engedélyével

gyakoribb, míg a déliekben ritkább (8,1–8,3/100000 fő). A közel 10 millió lakosú Magyarországon 2001-ben még 1292 új esetet jelentettek be a Nemzeti Rákregiszternek, azonban 2013-ban már 2375 volt ez a szám (40, 41).

A melanoma előfordulásának esélye az életkor előrehaladtával nő, de az utóbbi évtizedekben a 25–40 éves korosztályban is egyre gyakoribbá vált (42). Ennek egyik oka a légköri ózonréteg elvékonyodása, a másik pedig az elterjedt napozás és szoláriumhasználat („indoor tanning”). A gyermek- és serdülőkorban elszenvedett súlyos napégések pedig megduplázzák a felnőttkori melanoma kialakulásának kockázatát (43).

Összességében a melanoma mortalitása, életkorra standardizálva, 1/100000 fő alatt van, és nőkben alacsonyabb, mint férfiakban. A mutatószám Ázsiában (0,3 férfiak és nők esetében is), Afrikában (0,5 ill. 0,7) és Dél-Amerikában (1,0 ill. 0,6) alacsonyabb, míg Európában (2,0 ill. 1,3), Észak-Amerikában (2,6 ill. 1,2) és Ausztráliában (5,9 ill. 2,4) magasabb az átlagnál (39). Magyarországon a melanoma 2013-as halálozása 349 fő volt, tehát az incidencia egy hetede (41).

2.5.2 Molekuláris genetikai elváltozások melanomában

A melanoma rendszerint különösen nagyszámú (megabázisonként akár többszáz) szomatikus mutációval terhelt daganat (44). Következményként a növekedési útvonalak és sejtciklus deregulációja kontrollálatlan proliferációhoz vezet. A nagy számú genetikai károsodás közül azonban nem egyszerű szétválasztani a vezető („driver") és kísérő („passenger") eltéréseket.

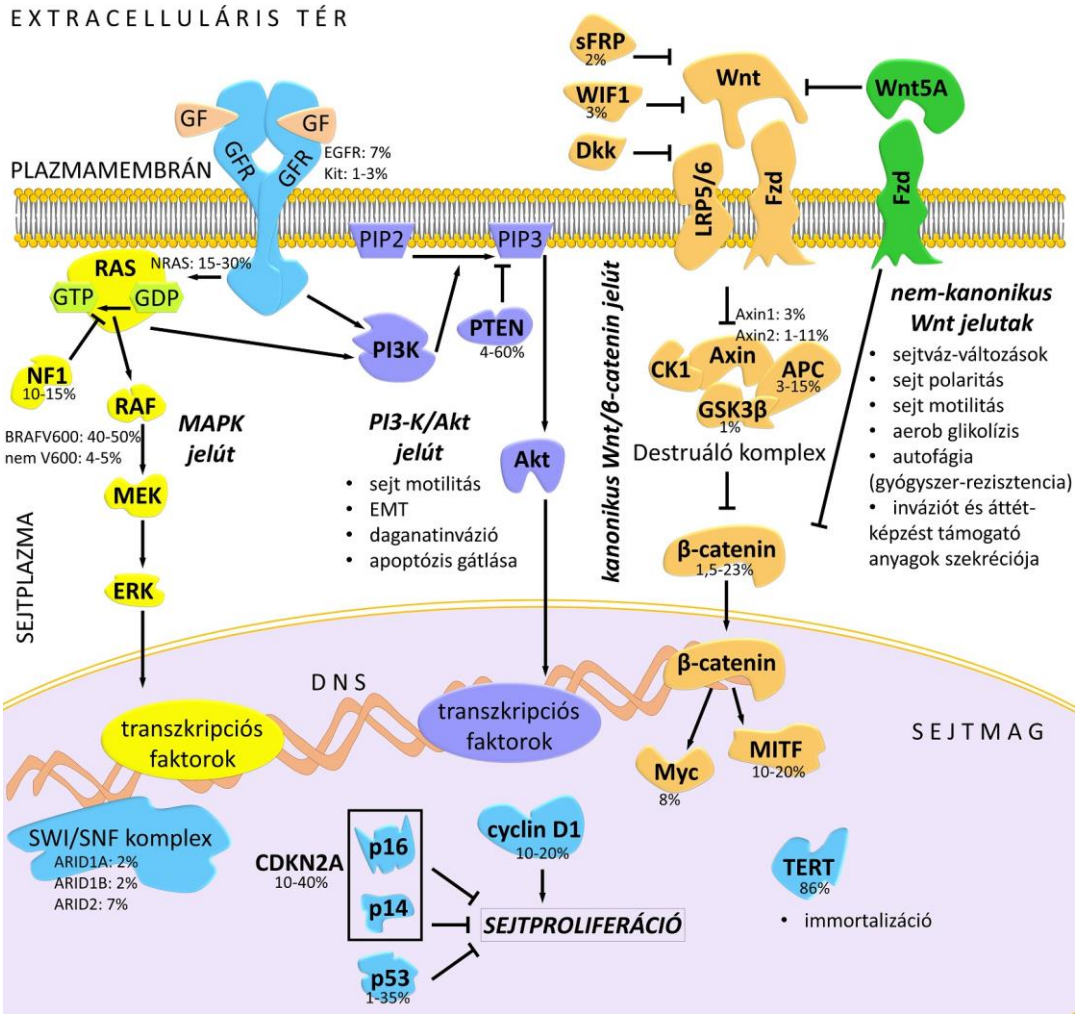
2.5.2.1 MAPK útvonal

Melanomákban a leggyakoribb onkogén hatás a MAPK (másként RAS/RAF/MEK/ERK) szignáltranszdukciós útvonal kóros aktivitása (34, 45) (**2. és 4. ábra**). A RAS fehérjék a plazmamembrán belső felszínéhez kötődő kis G-fehérjék, melyek guanozin-trifoszfátot (GTP) kötve aktív, guanozin-difoszfátot (GDP) kötve inaktív állapotban vannak (46). Az aktivációjukat fiziológiásan és némely neoplasztikus esetben is növekedési faktor-receptorok (melanomában pl. a Kit, Met, EGFR „epidermal growth factor receptor") ligandkötése, ill. felülregulációja vagy túlműködése okozza, ami a RAS-jelút további elemeit is működésbe hozza: melanomában a BRAF-ot és CRAF-ot, melyek aktiválják a MEK-et („MAPK/ERK kinase"), ami pedig az ERK-et („extracellular signal-regulated kinase") hozza működésbe, a sejtciklus beindításáért felelős további résztvevőket, transzkripciós faktorokat aktiválva. Az NF1 (neurofibromin 1) az NRAS működését gátolja a GTP hidrolízisével (47). UV-indukált melanomában a BRAF >40–50%-ban, az NRAS 15–30%-ban mutáns (már a tumorgenezis korai szakaszában is) (48); míg a MITF amplifikációja 10–20%-ban, a Myc (myelocytomatosis) amplifikációja 8%-ban, az EGFR-amplifikáció 7,4%-ban, a Kit-mutáció pedig összességében 1–3%-ban (de acrolentiginosus, mucosalis és lentigo maligna melanomában akár tízszer gyakrabban) fordul elő (34, 44, 45). Ugyancsak gyakori, 10–15%-os az NF1 funkcióvesztő mutáció aránya (3, 44, 49). Ezek alapján a Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas) négy melanoma genom-altípust különböztet meg: BRAF-mutáns, NRAS-mutáns, NF1-mutáns és tripla vad (50).

2.5.2.2 PI3K/Akt útvonal

Leírták melanomákban a PI3K/Akt (PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz) jelátviteli út zavarait is (34). A PI3K/Akt útvonal kulcseseménye a foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfát (PIP2) foszforilációja foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PIP3) (51). Ezt külső és belső

(pl. RAS vagy mutáns Kit általi) szignálok hatására a PI3K katalizálja, míg a PTEN („phosphatase and tensin homolog”) gátló fehérje ezzel ellentétes hatású (52). Az aktívvá vált PIP3 az Akt-ot hozza működésbe, amely további, a sejtosztódás irányában ható folyamatokat, transzkripciós faktorokat indít be. A sporadikus melanomák 60%-ában az



4. ábra. A melanomákban érintett legjelentősebb növekedési jelutak. A genetikai károsodások gyakoriságát a %-ban megadott érték jelöli. A MAPK útvonal (sárga) egymást aktiváló tagjai sorrendben: RAS, RAF, MEK, ERK. A RAS egy kis-G fehérje, melynek hatását az NF1 antagonizálja a GTP hidrolízisével. A PI3K /Akt útvonal (lila) fontosabb lépései: a PI3K komplex a PIP2-t PIP3-má foszforilálja, mely az Akt fehérjét aktiválja. A PTEN foszfatáz hatása a PI3K-ával ellentétes. Kanonikus Wnt/β-catenin jelút (barackszín) során a Wnt ligand kötődése a „frizzled” (Fzd) receptorhoz és az alacsony denzitású lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérjékhez (LRP5/6) a β-catenint destruáló komplex felbomlásához vezet, így a felhalmozódó β-catenin a sejtmagba transzlokálódhat, serkentve pl. a MITF és Myc transzkripcióját. A nem-kanonikus Wnt útvonalak (zöld) többek között a kanonikus jelút tagjait gátolják, valamint a sejtmozgást serkentik. Világoskékkel a fenti útvonalakon kívüli egyéb géntermékeket jelöltem, melyek károsodása a melanomagenezis során jelentőséggel bírhat. (GF: növekedési faktor, GFR: növekedési faktor receptora). Balla Péter ábrájának módosításával, az engedélyével (46).

Akt3 szelektív aktivációját (53), késői stádiumú daganatok kb. 20%-ában (vagy akár 60%-ában) pedig a PTEN hiányát figyelték meg (25, 34, 54, 55). A PTEN hiánya is Akt-aktivációhoz vezet, amely viszont a cyclin D1 fokozott szintézisét és apoptózis-gátlást eredményez. A PI3K/Akt útvonal aktivitásának szerepe van a daganat invazivitásában is, hozzájárul az epithelialis-mesenchymalis transitiohoz (EMT), fokozza a sejtmotilitást, valamint többek között a mátrix-metalloproteáz 9 (MMP9) aktivitását, mely pl. a bazálmembrán lebontásához járul hozzá (54).

2.5.2.3 Wnt útvonalak

A naevusokban magas expressziót mutató Wnt5A (Wnt: „wingless" + Int1) ligand (mely nem-kanonikus Wnt útvonalat indít) a radiálisan terjedő melanomákban lecsökken, majd vertikálisan növekedő és áttéti melanomákban ismét fokozódik, továbbá hozzájárul a sejtmigrációhoz és EMT-hoz (52, 54, 56). Az invazivitást támogató Wnt5A-jelút alapvetően a sejtproliferációt serkentő, kanonikus Wnt/β-catenin útvonalat antagonizálja. A kanonikus Wnt/β-catenin jelút a melanomák 30%-ában aktív, amihez hozzájárul a negatív szabályozó faktorok (pl. Dickkopf-fehérjék – Dkk, Wnt inhibitor faktor-1 – WIF1, „secreted frizzled-related protein"-ek – sFRP) csökkenése vagy a β-catenin lebomlást gátló mutációja ill. az útvonal egyéb tagjainak mutációja (pl. WIF1, sFRP, a β-catenin-t destruáló komplex tagjai: „adenomatous polyposis coli" – APC, „axis inhibition protein"-ek – Axin, „glycogen synthase kinase 3β" – GSK3β). A kanonikus útvonal a β-catenin felhalmozódásához és magi transzlokációjához vezet, ahol elősegíti a proliferációt pl. a cyclin D1, MITF és Myc transzkripciójának fokozásával. Ezen túl, a daganat elleni immunreakciót is gátolja (56). A metasztázisképzésnek azonban nem kedvez, ami a betegség prognózisa szempontjából előnyös. A MITF szerepe az expresszió aktivitásával függ össze: ha ez nagyon alacsony, a sejtöregedés irányában hat, de invazív, differenciálatlan melanomasejtekben is alacsony a szintje; magas MITF-expresszió esetén intenzíven proliferáló majd differenciálódó sejteket figyeltek meg. A MITF sejttúlélést segítő szerepét is leírták.

2.5.2.4 Egyéb különbségek radiális és vertikális növekedés között

A radiális és vertikális növekedésű melanomák közötti progressziót jól jellemzi a fokozott EMT, a sejtadhéziók felbomlásával, az E-cadherin csökkenésével, és az N-cadherin expressziójának fokozódásával (52, 56).

2.5.2.5 Sejtciklus-szabályozás

UV-indukált melanomában a sejtciklus-szabályozók génjei közül a CDKN2A mutációja kb. 10%, deléciója további 30%, a cyclin D1 génjének (CCND1) amplifikációja pedig 10–20% gyakoriságú (acralis és mucosalis melanomákban még nagyobb) (3, 34, 44, 54). Az invazív melanomák korai jellemzője a két allélt érintő CDKN2A-funkcióveszés, míg a prekurzor léziókban (dysplasticus naevus, *in situ* melanoma) csak egy allélt érintő mutáció figyelhető meg. Sporadikus melanomák eseteiben a CDK6 fokozott expresszióját (57), a CDK4 amplifikációját, valamint az RB-t kódoló RB1 (retinoblastoma) gén inaktiváló mutációját is leírták (58). A TP53 mutációi (tumor protein 53 gén, a p53 génje; 10–25% – ritkább, mint a legtöbb szolid tumorban) a további progresszió során alakulnak ki, jellemzően vastag primer és áttéti melanomákban, a MAPK-útvonal fent részletezett főbb mutációit kísérve (25, 44, 54). „Tripla negatív” melanomákban inkább az MDM2 („murine double minute”) amplifikációját figyelték meg, mely a p53 lebontásáért felel (25, 50). A TERT immortalizációhoz vezető mutációja már az invazívvá válás előtti intermedier elváltozásokban gyakori (az esetek közel felében, összességében akár a bőrmelanomák 86%-ában), valamint nem ritka melanomákban a SWI/SNF („switch/sucrose non-fermentable”) kromatin-remodelláló komplexum tagjainak (pl. ARID2: 7% ARID1A: 2%, ARID1B: 2%; ARID: „AT-rich interaction domain”) hibája sem, mely kromoszóma-eltérésekkel jár (3, 25, 59, 60). A SWI/SNF komplex fiziológiásan a gének expresszióját szabályozza a kromatinszerkezet átrendezésével.

2.5.2.6 Öröklött tényezők

A melanomák kb. 10%-a családi halmozódást mutat (61). Familiáris melanomák 10–40%-ában kimutatták a CDKN2A gén germinális mutációját (34, 62, 63). A gén által kódolt sejtciklusgátló $p14^{ARF}$ (ARF: „alternate reading frame”) és $p16^{INK4a}$ fehérjék diszfunkciója vagy hiánya melanomában a sejtproliferációt segíti elő. Az érintett családokban a hasnyálmirigy-adenocarcinoma és egyéb malignomák is gyakoribbak (64). Más familiáris melanoma-esetekben, ritkán, a CDK4 gén csírasejtes mutációját írták le, ekkor az azonos nevű fehérje $p16^{INK4a}$-kötő régiója változik meg, s nem képes kapcsolódni a CDK-gátlóval (65). Kisebb valószínűséggel, de melanoma fokozott kockázatával járhatnak bizonyos germinális MITF, MC1R vagy TERT allélváltozatok is (54).

2.5.3 A melanoma onkogenezise, klinikai/szövettani altípusai

A melanomák kétharmada *de novo* alakul ki, kisebb hányaduk egy megelőző festéksejtes anyajegy talaján (66). Az *in situ* melanoma megnagyobbodott sejtmagvú, szabálytalanul növekvő sejtekből áll, az epidermisen nem terjed túl, azonban invazív, non-CSD (felszínesen terjedő) vagy krónikus napfénykárosodással összefüggő (CSD: lentiginosus) melanomává fajulhat (3) (**2. ábra**).

A non-CSD melanoma prekurzor *in situ* neopláziájára (akárcsak a benignus naevusokra) a $BRAF^{V600E}$ mutáció, hisztopatológiailag pedig a pagetoid terjedés, tehát az epidermis valamennyi rétegét érintő fészkes vagy önálló sejtes szóródás jellemző (hasonlóan, mint az adenocarcinoma-sejtek Paget-kórban) (67). Felszínes naevussejtek UV-sugárzás által indukált transzformációjával jöhetnek létre, közönséges vagy dysplasticus naevusokból. A non-CSD melanoma invazív, felszínesen terjedő melanomává („superficial spreading melanoma", SSM) progrediál, mely horizontális (radiális) növekedési fázissal indul, később azonban vertikális fázisba válthat át és kifekélyesedhet. Az SSM összességében az invazív bőrmelanomák közel 70%-át adja, bár a kaukázusitól eltérő rasszokban ennél lényegesen kisebb az aránya (68-70).

Vertikális terjedési fázisban a tumort infiltráló lymphocyták jelenléte a melanoma elleni hatékony immunválaszra utalhat, azonban prognosztikai jelentőségéről megoszlanak a vélemények (71-74). Ebben a növekedési fázisban számítani lehet a daganat vér- vagy nyirokerekbe törésére, ami az áttétképzés előfeltétele (75, 76), valamint gyakori a gyors növekedés és ischaemia okozta kifekélyesedés is (77). Exulcerált melanoma esetén magas a helyi recidiva és a metasztázis megjelenésének kockázata, a halálozás rizikója pedig megduplázódik (73, 78).

A nodularis melanoma prekurzor lézió nélkül, priméren invazív daganatként alakul ki és már kezdetektől vertikálisan terjed. A melanoma esetek 15–30%-át teszi ki (79).

A CSD melanomák környezetében solaris elastosis, a daganatsejtekben pedig jelentős mutációs terheltség igazolja a tartós UV-károsodást (3, 24). Az ide tartozó *in situ* elváltozás, az ún. lentigo maligna (18). Ennek dermisbe törésével lentigo maligna melanoma alakulhat ki, mely az invazív melanomák 10–15%-át adja (70, 80). A non-CSD melanomával ellentétben ezekre nem jellemző a $BRAF^{V600E}$ mutáció, hanem más BRAF

eltérések (pl. V600K; K: lizin), valamint NRAS, NF1 és Kit mutációk fordulnak elő (3, 67, 81).

Az acrolentiginosus melanoma (ALM) a tenyéren, a talpon, a körmök alatt vagy paraunguinalisan alakul ki, és gyorsan progrediáló vertikális terjedés jellemzi. Összességében a melanomák kevesebb, mint 5%-áért felel, azonban sötét bőrűeknél és ázsiaiaknál kb. 70%-uk ebbe a szövettani típusba tartozik (39, 82). Acrolentiginosus és mucosalis (pl. szájüregi) melanomában a BRAF és NRAS-mutációkon kívül 15–30%-ban kimutatható a Kit aktiváló mutációja és amplifikációja is, amit CSD melanomákban is hasonló arányban figyeltek meg, valamint gyakori a CCND1 amplifikációja (34, 44).

2.5.4 A melanoma prognosztikus faktorai

A melanoma hagyományos prognosztikus faktorai, a horizontális/vertikális terjedés, a lymphocyta-infiltráció, az érbetörés és az exulceráció mellett (83) a Clark-szint a szöveti invázió mélységre utal (80), a Breslow-vastagság az invazív daganat pontos vastagságára (84), míg a mitotikus index az osztódó sejtek számára. A melanoma regresszióját régóta rossz prognosztikus tényezőnek tartják, hiszen gyakran jár együtt áttétes esetekkel (73, 85). Újabban viszont megkérdőjelezik baljóslatú megítélését (86).

A primer melanoma közelében lévő metasztázisokat szatellitáknak nevezzük (87). Jelenlétük esetén regionális nyirokcsomóáttétre is számítani kell. A mikroszatelliták a fő tumormasszától 2 cm-es környezeten belül elhelyezkedő, legalább 50 µm átmérőjű melanomafészkek a reticularis dermisben vagy a subcutisban (73, 88). Az *in transit* metastasis a primer tumortól legalább 2 cm-re helyezkedik el, az elvezető nyirokerek lefutásának megfelelően (83). Regionális nyirokcsomóáttét esetén a mortalitás összefüggést mutat azzal, hogy mikro- vagy makrometasztázisról van-e szó, valamint összefügg az érintett nyirokcsomók számával is (89).

2.5.4.1 A Breslow-vastagság

Mivel az értekezésben bemutatott saját vizsgálatokban a primer melanomák 1 mm-es tumorvastagságnál lettek szétválasztva, kitérnék ennek jelentőségére.

1970-ben megjelent tanulmányában Alexander Breslow a melanomák vastagságát századmilliméterben fejezte ki, s ez az érték összefüggést mutatott a nyirokcsomóáttét megjelenésével és az átlagos túlélési idővel (84). A Breslow-vastagság a túlélés legjelentősebb független prognosztikus faktora lokalizált bőrmelanoma esetén (75). Elsősorban a tumorvastagságon, másodsorban a kifekélyesedésen alapul az „American Joint Committee on Cancer" által 2017-ben frissített TNM-beosztás (8. kiadás) T kategóriája is (88). A túléléssel való összefüggést az **1. táblázat** mutatja be. Nyirokcsomó-negatív esetben az IA stádiumú (pT1a/b N0 M0) melanoma 5 éves betegségspecifikus túlélése 99%-osnak bizonyult, míg vastagabb daganatoknál csökkent.

1. táblázat. A TNM 8. kiadásában a T kategória összefüggése a melanoma-specifikus túléléssel, N0 M0 vagyis áttétmentes esetben. Gershenwald és mtsai. közleménye alapján (88).

T	Breslow-vastagság	Exulceráció	10 éves melanoma-specifikus túlélés
T1a	< 0,8 mm	nincs	98%
T1b	< 0,8 mm	van	96%
	0,8–1,0 mm	nem számít	
T2a	1,1–2,0 mm	nincs	92%
T2b	1,1–2,0 mm	van	88%
T3a	2,1–4,0 mm	nincs	88%
T3b	2,1–4,0 mm	van	81%
T4a	> 4,0 mm	nincs	83%
T4b	> 4,0 mm	van	75%

2.5.5 A melanoma kezelése

Lokális vagy lokoregionális kiterjedésű melanoma esetén sebészi kezelés szükséges, amit vastag primer tumor vagy regionális érintettség esetén adjuváns szisztémás kezelés követ (90). Irreszekábilis betegségben a szisztémás terápia az elsődleges. Ennek jelenlegi standard módszerei az immunterápia [PD-1 („programmed cell death protein-1") gátlók: nivolumab, pembrolizumab; CTLA-4 („cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4")gátló: ipilimumab], valamint $BRAF^{V600}$-mutáns esetekben valamely BRAF-gátló (vemurafenib, dabrafenib illetve encorafenib) kombinálása MEK-inhibitorral (cobimetinib, trametinib illetve binimetinib). Kit-mutáns esetekben adható Kit-gátló hatású tirozinkináz-inhibitor (imatinib, nilotinib) (91), NRAS-mutáns esetekben pedig a

MEK-gátlóktól várható szerény hatás (92). A kemoterápia (pl. dacarbazine, temozolomide) hatékonysága csekély.

A melanoma 10 éves túlélése lokalizált betegségben stádiumtól függően 75–98% (88), míg távoli áttétes betegeknél az egy éves túlélés 10–62% (73, 78, 93).

2.5.6 A melanoma differenciáldiagnosztikája

Melanoma gyanújakor dermatoszkópos vizsgálat végzendő, amit az ABCD-szabály szerint értékelnek (94, 95). A módszer szenzitivitása 84%, specificitása 75% (96).

A szövettani differenciáldiagnosztika során gyakran alkalmaznak immunhisztokémiai vizsgálatot, bár ezek elsősorban csak a melanocytás eredetet igazolják, nem pedig a malignitást (97, 98). Ilyen markerek az S100 („soluble in 100%”), a HMB45 („human melanoma black-45”) antitest, mely a gp100 glikoproteinnel reagál, a melan-A/MART-1 („melanoma antigen recognized by T cells-1”), a tirozináz, a SOX-10 [„SRY (sex-determining region Y)-related HMG (high mobility group)-box 10”] (99), a vimentin, a neuronspecifikus enoláz (NSE), a CD63 (CD: „cluster of differentiation”), a melanocyta belső membrán antigén (melyet KBA62 antitestklónnal mutatnak ki), valamint a MITF.

Differenciáldiagnosztikai problémát okozhat a naevus talaján kifejlődött melanomák dysplasticus naevusoktól való elkülönítése (25, 100, 101). Sajnos ezt megnehezíthetik az átfedő klinikai és szövettani jellemzők, valamint a megbízhatóan reprodukálható biomarkerek hiánya (102, 103). Erre az említett, melaninképzésben vagy általános sejtfunkciókban résztvevő markerek sem alkalmasak, hiszen egyaránt előfordulnak benignus naevusokban és melanomákban is.

2018-ban publikálták, hogy a PRAME („preferentially expressed antigen in melanoma”) fehérje diffúzan kimutatható volt a melanomák nagy többségében, míg a benignus naevusok legfeljebb fokálisan jelölődtek, diffúz reakció utóbbiaknál csak elvétve fordult elő (104, 105). A marker a rutin patológiai diagnosztikában is terjedni kezdett (106).

A melanomákban érintett növekedési utak genetikai károsodását már a benignus naevusok is hordozhatják, mint például aktiváló $BRAF^{V600E}$ mutációt (24), vagy a $p16^{INK4a}$ és $p14^{ARF}$ sejtciklusgátlókat kódoló CDKN2A gén funkcióvesztő mutációját (35). Az érintett növekedési utak sokfélesége és az átfedő genetikai eltérések nehezítik a

malignitás verifikálását kétes dignitású laesiókban. Ugyanakkor az aberráns sejtproliferáció a malignus fenotípus jellegzetessége, és valamennyi, rosszindulatú daganathoz vezető „upstream” jelútvonal a sejtciklus szabályozórendszerében egyesül (107). A rendellenes és intenzív sejtreplikáció, mint a malignomák többségében, melanomában is a malignitás és agresszív daganatviselkedés jellemzője lehet (108, 109).

Az 1950-es évek eleje óta ismert, hogy magas mitotikus rátájú melanomákban szenvedő betegek túlélése rendkívül alacsony (73, 110). A mitotikus (vagy mitózis) index (vagy ráta) azt fejezi ki, hogy a melanoma metszetének 1 négyzetmilliméterén hány sejt látható a mitózis fázisában (111). A mérést a legintenzívebb osztódású („hot spot”) régióban mérik. Úgy találták, hogy ha a mitotikus index 0, a halálozás 4%-ra tehető, míg ha ennél nagyobb, a mortalitás 31% (112). Multivariáns analízissel a mitotikus ráta erős prognosztikus faktornak bizonyult (113). A melanomasejtek proliferációjának megítélésére gyakran a Ki67 marker jelölését alkalmazzák, a legelterjedtebben a MIB-1 monoklonális antitesttel (114). A fehérje azonban dysplasticus naevusokban is előfordul, tehát a differenciáldiagnosztika során ez sem ad egyértelmű választ a daganat malignitásának kérdésére (115). Számos kutatócsoport tanulmányozott egyéb sejtciklusmarkereket is, azonban átfogó, a daganatprogresszió során a sejtciklusfrakciókat elkülönítő vizsgálatok nem történtek (116-120). A sejtciklust vizsgáló munkánkkal közel egy időben két publikáció jelent meg, melyekben kritikus melanocytás elváltozásokat tanulmányoztak, a rosszindulatúság megállapítására alkalmas markerek után kutatva. Az egyik egy fluoreszcens *in situ* hibridizáción (FISH) alapuló tanulmány volt Myb (6q23; myeloblastosis), CCND1 (11q13), RREB1 (6p25; „Ras responsive element binding protein 1”) és 6-os kromoszóma centromer (CEP6, „centromeric portion of chromosome 6”) génpróbákkal (121, 122), a másik egy kombinált fehérjeexpressziós profil a BIM („BCL-2 interacting mediator”, Bcl-2: „B-cell lymphoma-2”), BRG1 („brahma-related gene”), cullin 1 és ING4 (ING: „inhibitor of growth”) fehérjékkel (123). Sajnos ezeknek a módszereknek a reprodukálhatósága és megbízható kiértékelésük nehézkes. Azonban immunhisztokémiai festéssel a sejtciklusmarkerek könnyen értékelhető magi jelet adhatnak archivált szöveti metszeteken is, lehetővé téve a sejtciklus eltérő szakaszaiban lévő főbb sejtfrakciók meghatározását a dinamikusan változó sejtcsoportokban (107). Ez a megközelítés rutin diagnosztikus vizsgálatokra is alkalmas lehet.

2.6 A sejtciklus

A szomatikus sejtek kettéosztódásának folyamata a sejtciklus, melynek öt fázisa különíthető el (124, 125). A két fő fázis a DNS megkettőződésével, így az eukromatin állomány megnövekedésével járó S fázis, valamint a kromoszómák szétválását jelző mitózis, M fázis. A köztes ún. G1, ill. G2 „gap" előkészítő fázisokban pedig az előbbiek végrehajtásához szükséges fehérjék szintézise zajlik. A G0 fázis a sejtek cikluson kívüli nyugalmi állapota.

2.6.1 A sejtciklus-progresszió szabályozása

2.6.1.1 G1 fázis

A G1 fázis során a fő szabályozók a cyclin D izotípusok CDK4-gyel és CDK6-tal alkotott komplexei (124) (**5. ábra**). A cyclin D szintézisét növekedési faktorok által indukált szignáltranszdukciós folyamatok eredményezik. Ugyanezek a folyamatok felelősek a CDK4/6-gátló INK4-család tagjainak ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, $p19^{INK4d}$) proteaszomikus lebontásáért is. A felépült cyclin D-CDK4/6 komplex működését gátolhatja a CIP/KIP („CDK interacting protein/kinase inhibitory protein") család fehérjéinek [$p21^{WAF1/CIP1}$ (WAF1: „wild-type p53-activated fragment-1"), $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$], kötődése, azonban más megfigyelések a sejtciklust támogató szerepükre is rávilágítottak: például a $p27^{KIP1}$ szerepet játszik a cyclin D-CDK komplexek kialakulásában és sejtmagi transzportjában (126), valamint a cyclin D-CDK4/6 komplex a $p21^{WAF1/CIP1}$ és $p27^{KIP1}$ fehérjék lekötésével megakadályozza, hogy azok a későbbiekben gátolhassák a CDK2 működését (8, 127). Az aktív cyclin D-CDK4/6 komplex foszforilálja egyebek között az RB-t, mely mindaddig gátló komplexet képzett valamely E2F („adenovirus early gene E2 promoter binding factor") és DP („dimerization partner") transzkripciós faktor heterodimerével (128). A sejtciklusban ez az esemény a restrikciós pont, ahonnét már nincs szükség a növekedési faktorok jelenlétére.

A CDK-gátlók közül a $p21^{WAF1/CIP1}$ a DNS-károsodáskor aktiválódó p53 hatására szintetizálódik (128). A $p21^{WAF1/CIP1}$ indukciója a G1 fázist jelentősen lelassítja („G1 arrest"), ami lehetőséget biztosít a DNS „repair" mechanizmusok működéséhez. A p53 negatív szabályozója az MDM2, amelynek kötődésekor a p53 lebomlik. Az MDM2-t viszont a $p14^{ARF}$ gátolhatja, így megakadályozva a p53 inaktiválását.

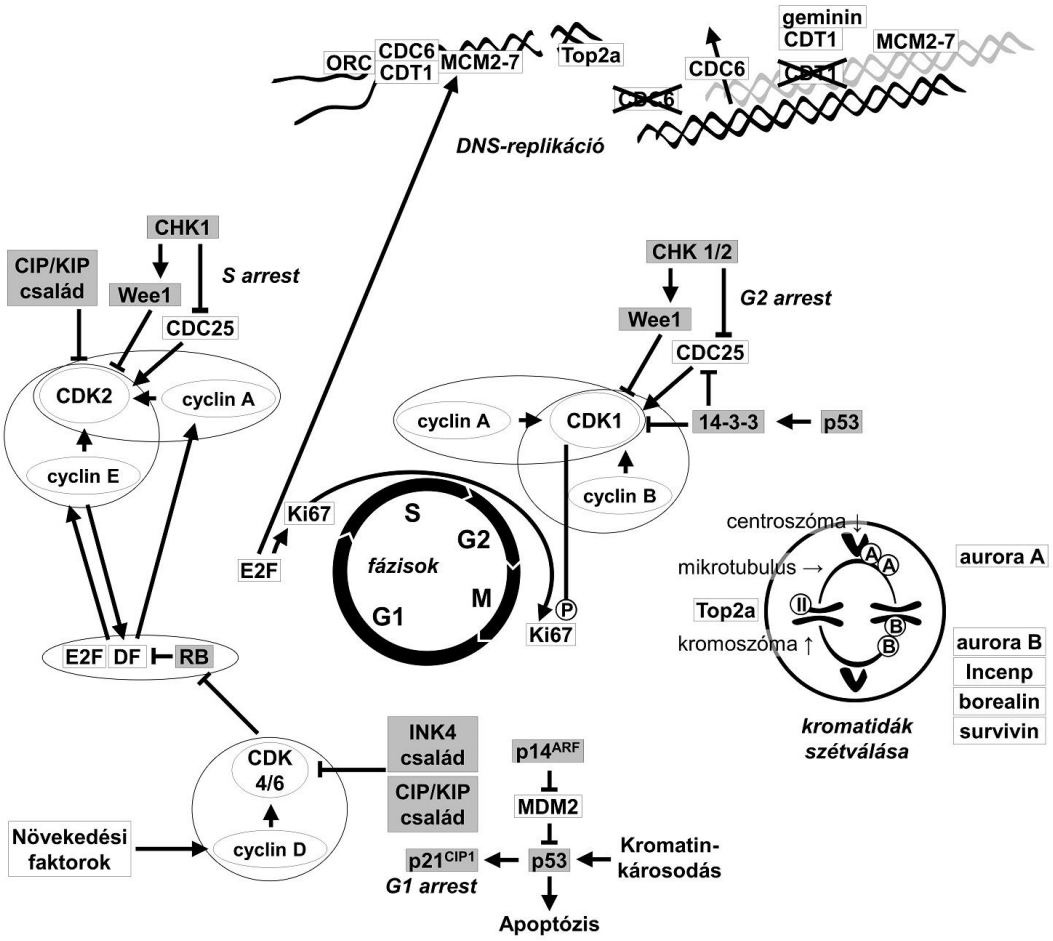
Az RB gátlása alól felszabadult E2F-DP komplex olyan gének transzkripcióját indítja el, mint a cyclin E és A, CDC25 (CDC: „cell division cycle”), de fokozza a $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1/CIP1}$, E2F, CDK1 expresszióját, valamint a DNS-replikáció során szereplő fehérjék szintézisét is (128).

2.6.1.2 Poszt-G1 fázisok

A G1 és S fázis közti átmenetben a cyclin E a CDK2-vel képez komplexet. Az aktív cyclin E-CDK2 komplex foszforilálja az RB-t, melynek hatására több E2F-DP szabadul fel a gátlás alól, valamint foszforilál más, a poszt-G1 fázisokban szereplő fehérjéket is. Az S fázisban a cyclin E gyorsan lebomlik, helyét pedig a cyclin A veszi át, ugyancsak a CDK2-vel komplexet képezve. Ez a komplex további sejtciklus-szabályozókat foszforilál (pl. Wee1, CDC25) (8, 129, 130). A cyclin E/A-CDK2 komplexeket a CIP/KIP CDK-inhibitorok ($p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$), a Wee1-általi tirozinfoszforiláció és a CDC25A-inaktiváció gátolhatják, az utóbbi S fázisban történő megrekedést eredményezve („S arrest”). A Wee1-et aktiváló illetve a CDC25 fehérjéket gátló foszforiláció a CHK1 („checkpoint kinase”) feladata.

A G2 és M fázis átmeneti szakaszában a cyclin A a CDK1-gyel képez komplexet, míg az M fázisban a cyclin B-CDK1 komplex dominál (131). A CDK1-et a Wee1 kináz foszforilálva inaktív állapotban tartja, míg a CDC25 általi defoszforiláció fel nem oldja (8, 129). DNS-károsodás esetén a 14-3-3 proteinek kizárják a cyclin B-CDK1 komplexet a sejtmagból a plazmába, s így felfüggesztik a sejtciklust. A 14-3-3 fehérjék egyéb proteinek magba jutását is gátolják, például az interfázis alatt a CDC25-öt tartják távol a sejtmagtól. A G2 fázisban DNS-károsodás esetén a CDC25-öt a CHK1 és CHK2 kináz foszforilálja, s így azt 14-3-3 proteinek kötik meg. A DNS-károsodáskor felszaporodott aktív p53 fokozza a 14-3-3σ génjének transzkripcióját. A sejtciklus G2 fázisban történő megrekedését („G2 arrest”) a Wee1 aktivitása és a CDC25 gátlása eredményezheti.

Az aurora kinázok szerin/treonin kinázok, melyek elsősorban az M fázist szabályozzák (132, 133). Az aurora A az S fázistól a centroszómákhoz kötődik, segíti azok érését és az M fázisban a mitotikus orsó működését. Az aurora B a kromoszómákban és a mitotikus orsóban foglal helyet, utóbbiban a CPC („chromosomal passenger complex”) tetramer része, melynek további három tagja az Incenp („inner centromeric protein”), a borealin



5. ábra. A sejtciklus szabályozásának vázlatos ábrázolása Otto és mtsai. valamint Vermeulen és mtsai. közleményei alapján (8, 128). A sejtciklus előrehaladását biztosító szabályozókat fehér háttérrel, a gátlókat szürke háttérrel ábrázoltam. A sejtciklus fő irányítói a cyclinek CDK-okkal alkotott komplexei. Növekedési faktorok határára indul meg a G1 fázis, a cyclin D-CDK4/6 komplex szereplésével. Ennek gátlói az INK4 család (pl. $p16^{INK4a}$) és bizonyos CIP/KIP fehérjék (pl. $p21^{WAF1/CIP1}$). Kromatinkárosodás esetén a p53 aktiválódik, mely többek között a p21 szintéziséhez, így a sejtciklus leállásához („G1 arrest") vezet. A p53 gátlója az MDM2, melyet viszont a $p14^{ARF}$ blokkol. Ha a sejtciklus tovább halad, a cyclin D-CDK4/6 az RB fehérjét gátolja, így felszabadul az E2F-DF komplex, mely a cyclin E-CDK2 komplex kialakulásához vezet, amit az S fázisban a cyclin A-CDK2 komplex vált fel. A CDK2-komplexek gátlói a CIP/KIP fehérjék (pl. $p27^{KIP1}$) és a Wee1, utóbbinak a hatását a CDC25 antagonizálja. A CHK1 foszforilációval a Wee1-et aktiválja, a CDC25-öt pedig gátolja („S arrest"). Ha a sejtciklus továbblép, a cyclin A-CDK1 (G2/M fázis) majd cyclin B-CDK1 komplexek (M fázis) kapnak szerepet. Ezeket a Wee1 és CDC25 fehérjéken kívül (melyeket a CHK1-2 foszforilál) a 14-3-3 fehérje is szabályozza, ami egy p53-indukálta gátló protein („G2 arrest"). Az aurora kinázok fő szerepe a kromoszómák szétválása során és annak előkészítésében határozható meg. Az aurora A (Ⓐ) a centroszómára és a proximális mikrotubulus-szakaszokra, az aurora B (Ⓑ) (komplexet képezve az Incenp, borealin és survivin fehérjékkel) különböző kromoszómarégiókra és a közeli centrális mikrotubulus-szakaszokra lokalizálódik. A Top2a (Ⓘⓘ) a kromatin szerkezeti változásait a DNS hasításával segíti elő, melynek az S és M fázisban is szerepe van. A Ki67 interfázis alatt a DNS-hez kötődik, majd az M fázisban a CDK1 foszforilálja (Ⓟ), így leválik a DNS-ről. Az MCM2-7 komplex a CDC6 és CDT1 fehérjékkel már a G1 fázisban kijelölik a DNS-replikációs origót (ORC: origót felismerő komplex). DNS-szintézist követően ezek leválnak és inaktiválódnak, a geminin a CDT1-et köti meg.

és a survivin, szerepe pedig a kromoszómák kondenzációjában és szétválásában, valamint a citokinézis során van.

2.6.2 DNS-replikáció engedélyezés, represszió és a DNS-tranzakciók szabályozása

A replikáció folyamatában nélkülözhetetlen szerepet jut az MCM2-7 replikációt engedélyező komplexnek (134). A CDC6 és CDT1 („CDC10 dependent transcript-1") fehérjék segítségével az MCM2-7 komplexek már a G1 fázis elején hozzákötődnek a magi DNS-ek replikációs origóihoz, így mintegy megjelölve a majdani DNS-szintézis kiindulási helyeit. A hexamer az S fázis során a DNS szuperspirál széttekerésében is szerepet játszik. A replikáció alatt az MCM-alegységek foszforilálódnak és leválnak a DNS-ről, ugyanakkor a CDC6 és CDT1 is foszforilálódik és inaktiválódik a cyclin A-CDK2 komplex által, az MCM-komplex újbóli DNS-hez kötődését megelőzendő. A foszforilált MCM-fehérjék a sejtmagban maradnak, a CDC6 kikerül a sejtplazmába, a CDT1 pedig részben degradálódik, részben a geminin gátolja aktivitását. A geminin az S, G2 és korai M fázisban mutat expressziót, szerepe ciklusban levő sejtekben az újabb ciklus indításának megakadályozása az M fázis befejezése előtt. A késői M fázisban a geminin és a cyclin A lebomlik, így a CDT1 felszabadul a gátlás alól, ugyanakkor a CDC6 is visszakerül a kromatinállományhoz, amikor a sejtmaghártya felbomlik. Mindezek következtében az utódsejtekben újra lehetőség nyílik a MCM-komplexek kötődésére a replikációs origókhoz.

A topoizomerázok olyan enzimek, melyek a kromatin szerkezeti változásait úgy idézik elő, hogy tranészterifikációs reakcióval reverzibilisen hasítják a DNS-láncokat, miközben a szabad végeket megkötik (135). Erre szükség van valamennyi DNS-tranzakció: a transzkripció, a „repair" mechanizmusok, a replikáció, a rekombináció és a kromoszómák kondenzációja során egyaránt, amikor a kitekeredett DNS-szakasz körül megnő a torziós feszültség, s ezt oldani kell. Az I-es típusú topoizomerázok működésük során csak az egyik DNS-szálat hasítják, míg a II-es típusúak mindkettőt.

A Ki67 fehérje kimutatását már az 1990-es évek eleje óta alkalmazzák a patológiában, osztódó, ciklusban lévő sejtek azonosítására (136). A protein biológiai funkciója azonban mindmáig tisztázatlan. Az eddigi megfigyelések szerint szerepet játszik a kromatin strukturális változásaiban mind a replikáció, mind a mitózis során, részt vesz a kettős

szálú DNS-törések kijavításában, a kromatin maghártyához rögzítésében, elősegíti a cyclin B nukleáris transzportját, szerepe van a nucleolus szétesésében majd újraépülésében, szabályozza a mikrotubulusok és a centroszóma megfelelő működését, valamint az osztódás lezajlását követően szerepet játszhat a riboszómák működésének helyreállításában. A Ki67-nek több izoformája ismert, funkciójukat pedig közvetlenül vagy Ki67-asszociált proteinek közvetítésével fejtik ki. A Ki67 expressziója a G1 fázisban kezdődik meg, többek között E2F hatására, majd a mitózisig folyamatosan növekszik, annak végén viszont a fehérje szintje gyorsan lecsökken (137, 138). A Ki67 interfázis alatt a DNS-hez kötődik, majd az M fázisban a CDK1 foszforilálja, ezzel leválasztva a DNS-ről.

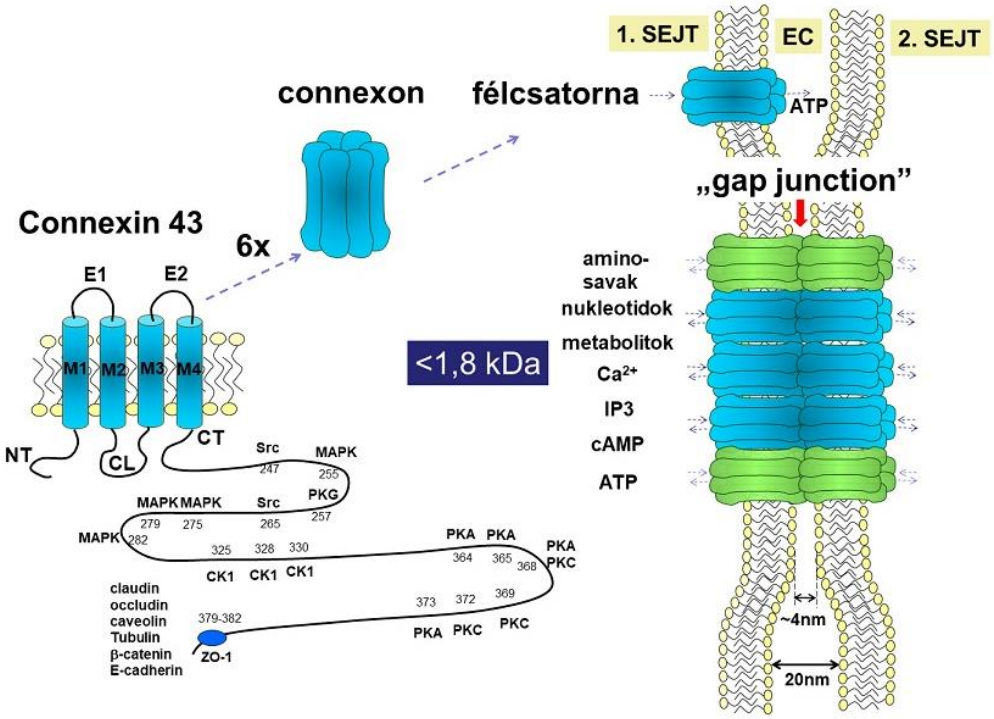
2.7 Connexinek és direkt sejtkommunikációs csatornáik

A multicelluláris szervezet összehangolt működéséhez elengedhetetlen a sejtek szoros együttműködése, mely közvetett receptor-ligand kapcsolatokon (pl. növekedési faktorok és receptoraik; vagy sejtadhéziós molekulák interakcióin), ill. közvetlen, ún. metabolikus kapcsolatokon alapul (139, 140). Utóbbit a szomszédos sejtek közötti direkt kommunikációs csatornák biztosíthatják. A réskapcsolatok („gap junction”, GJ) gerinctelenekben innexin hexamerekből (innexin: „invertebrate connexin”), gerincesekben viszont az ezekkel csak csekély szekvenciahomológiát mutató, tehát tőlük függetlenül kialakult connexin (Cx) hexamerekből épülnek fel. Jól szabályozott pórusaik 2–3 nm átmérőjűek, így ionok és más kis hidrofil molekulák transzportját teszik lehetővé. Élettani jelentőségüket kiemeli a fajok közötti nagyfokú evolúciós konzerváltságuk, valamint, hogy már a korai egyedfejlődésben megjelennek, és a kifejlett szövetekben is szinte valamennyi magvas sejtben előfordulnak (141). Gerincesekben is jelen vannak azonban az innexinekkel homológ fehérjék, a pannexinek, melyek a sejtközötti térrel közlekedő csatornákat alkotnak, akárcsak a connexinekből felépülő, de a szomszédos sejtekkel közvetlen összeköttetést nem létesítő félcsatornák („hemichannel”).

2.7.1 A connexin csatornák felépítése és altípusai

A gerincesekben egy connexin fehérje egy-egy citoplazmatikus N- (NT) és C-terminális (CT) doménből, négy transzmembrán (M1–4) szakaszból, közöttük két extracelluláris (E1–2) és egy intracelluláris (CL) hurokból („loop”) áll, melyek sorrendje: NT–M1–E1–

M2–CL–M3–E2–M4–CT (140, 142, 143) (**6. ábra**). A különböző Cx-izotípusok között a karboxil-láncvég (CT) mutatja a legnagyobb variabilitást, számos szabályozó foszforilációs hellyel (139, 144), a connexinek kettős nómenklatúrája is ehhez köthető. A géneket molekuláris-evolúciós rokonságuk szerint soroljuk az α, β, γ, δ vagy ε családba (pl. a legősibb és legelterjedtebb connexin génje a GJA1 – „gap junction α1”), míg magukat a fehérjéket molekulasúlyuk alapján nevezzük el (pl. a GJA1 által kódolt, 43 kDa-os Cx43). Sajnos a szakirodalomban a különböző évtizedekben a különböző szerzők által használt, valamit az eltérő fajokban említett connexinek elnevezése gyakran ellentmondásos. A **2. táblázatban** az ember és a házi egér (mint a másik leggyakrabban vizsgált faj) connexinjeinek nevezéktanát mutatom be. Emberben 21, egérben 20 izotípus ismert.



6. ábra. A Cx43 molekula, a connexon félcsatornák és a „gap junction” réskapcsolatok felépítése. A connexin molekula C-terminális szakaszán számos foszforilációs hely, valamint fehérjeinterakciókra alkalmas régió van. Hat connexin molekula épít fel egy connexon félcsatornát, mely az extracelluláris térbe, vagy szomszédos sejtek között közvetít <1,8 kDa méretű hidrofil metabolitokat, szabályozó molekulákat és ionokat. Az újonnan képződő (zöld) csatornák a széleken csatlakoznak a réskapcsolati plakkhoz, ahol a dokkolásánál a szomszédos sejtek membrán távolsága ötödére csökken. (CK1: kazeinkináz-1; EC: extracelluláris tér az 1. és 2. sejt között; IP3: inozitol-trifoszfát; ZO-1: zonula occludens-1 protein). Krenács Tibor ábrája, az engedélyével felhasználva (140).

2. táblázat. Az ember és az egér (mCx) connexinjeinek nomenklatúrája. Emberben a gén kromoszomális lokalizációját, valamint a mutációkhoz kapcsolt betegségeket, tüneteket is feltüntettem. Sohl, Bedner és munkatársaik közleményei, valamint Krenács Tibor MTA doktori értekezése alapján (140), kiegészítve Srinivas és mtsai. valamint Kelly és mtsai. közleményeiből (194, 196).

Ember				***Egér***	
Gén	**Fehérje**	**Gén lokalizációja**	**Mutáció okozta károsodás**	**Gén**	**Fehérje**
α család					
GJA1	Cx43	6q	Csontfejlődési rendellenességek, bőrtünetek, szívritmuszavar	Gja1	mCx43
GJA3	Cx46	13q	Szürkehályog	Gja3	mCx46
GJA4	Cx37	1p		Gja4	mCx37
GJA5	Cx40	1q	Szívritmuszavar	Gja5	mCx40
nincs				Gja6	mCx33
GJA8	Cx50	1q	Szürkehályog	Gja8	mCx50
GJA9 (GJA10)	Cx59 (Cx58)	1p		nincs	
GJA10	Cx62	6q		Gja10	mCx57
β család					
GJB1	Cx32	Xq	Demyelinisatio (elsősorban perifériás idegrendszeri)	Gjb1	mCx32
GJB2	Cx26	13q	Hallásvesztés, bőrtünetek	Gjb2	mCx26
GJB3	Cx31	1p	Hallásvesztés, súlyos bőrelváltozások	Gjb3	mCx31
GJB4	Cx30.3	1p	Bőrtünetek	Gjb4	mCx30.3
GJB5	Cx31.1	1p		Gjb5	mCx31.1
GJB6	Cx30	13q	Hallásvesztés, bőrtünetek	Gjb6	mCx30
GJB7	Cx25	6q		nincs	
γ család					
GJC1 (GJA7)	Cx45	17q		Gjc1	mCx45
GJC2 (GJA12)	Cx47 (Cx46.6)	1q	Demyelinisatio (központi idegrendszeri), lymphoedema	Gjc2	mCx47
GJC3 (GJE1)	Cx30.2 (Cx31.3)	7q	Hallóideg-károsodás	Gjc3	mCx29
δ család					
GJD2 (GJA9)	Cx36	15q		Gjd2	mCx36
GJD3 (GJA11, GJC1)	Cx31.9	17q		Gjd3	mCx30.2
GJD4	Cx40.1	10p		Gjd4	mCx39
ε izotípus					
GJE1	Cx23	6q		Gje1	mCx23

Hat connexin fehérje egyetlen connexonná áll össze, ami rendszerint egyféle izotípusból felépülő homomer, azonban többfajta izotípus heteromert is létrehozhat (**6. ábra**). Az oligomerizáció a transz-Golgi hálózatban vagy az endoplazmás retikulumokban zajlik, és csak meghatározott connexin-izotípusok között történhet, azonban pl. alfa- és béta-connexinek között nem (145). A kompatibilitást az M3, M1 és NT szakaszok bizonyos szekvenciái biztosítják. Oligomerizáció során a connexineket másodlagos kötések (pl. sókötések, hidrogénkötések) kapcsolják össze, a szerkezet stabilitásához az egyes connexineken belül kialakult kötések (pl. E1 és E2 doménekben diszulfidhidak) is hozzájárulnak. A szomszédos sejtek közötti réskapcsolat kialakulását (dokkolás) az E1 és E2 szakaszok közötti hidrogénkötések biztosítják. Ha a kapcsolat két egyforma connexin izotípus között alakul ki, homotípusos, ha eltérőek között jön létre, heterotípusos jelzővel illetjük (pl. májsejtekben Cx26/Cx32 heterotípusos csatornák (141)). A sejtmembránon a réskapcsolatok százai plakkokba tömörülnek. Ezeken a területeken a szomszédos sejtek közötti távolság ~10 nm-ről az ötödére csökken, ami erőteljes adhéziót feltételez (146).

2.7.2 A connexin csatornák képződése

A réskapcsolatokon 1–1,8 kDa molekulasúlynál kisebb hidrofil metabolitok, másodlagos hírvivők és ionok képesek átdiffundálni (139, 140, 147, 148). Áramlásukat azonban több tényező befolyásolja: 1.) függ a réskapcsolatok számától, 2.) a metabolit-permeabilitást és ionszelektivitást meghatározó izotípus-összetételtől, 3.) valamint a csatornák nyitott állapotától (149).

A réskapcsolatok számát, tehát a plakkok méretét a connexinek termelődése, sejten belüli transzportja és lebomlása határozza meg (150). Ezek igen dinamikus folyamatok, hiszen a connexinek féléletideje rövid, Cx43 esetében mintegy másfél óra, ami a homeosztázis szabályozásában gyors adaptációt biztosít (151). A génátírást szabályozó transzkripciós faktorok szövet- és Cx-izotípusfüggők, és epigenetikai szabályozásuk is bizonyított (152, 153). A transzlációt követően a connexinek már az endoplazmás retikulumokban vagy a Golgi-testecskékben connexon hexamerekké állnak össze, majd vezikulákban a mikrotubulusok mentén transzportálódnak a plazmamembránhoz (151, 154). A connexinek általában a sejtmembrán lipid tutaj („lipid raft”) doménjaiba épülnek be, melyek koleszterinben és szfingolipidekben gazdag területek, és számos együttműködő fehérjét magukba gyűjtenek (155). A réskapcsolat plakkok a széleik mentén épülnek fel,

míg internalizációjukkor dupla membránba csomagolt, teljes csatornákat magukban foglaló vezikulumok fűződnek le a plakkok középső régióiból (156). A connexinek mono-ubikvitinálása a lizoszómális lebontást, míg poli-ubikvitinálásuk a proteoszómális degradációt indukálja (157). Az epidermális növekedési faktor („epidermal growth factor", EGF), a tumor promoter forbol-észter és a karcinogén diklórdifenil-triklóretán hatásaként egyaránt megfigyelték a Cx43 internalizációjának, ubikvitinálásának és lebontásának serkentését, aminek szerepe lehet a daganatképződésben és progresszióban (158-160). Az internalizált connexinek azonban képesek visszakerülni a plazmamembránba is, aminek szerepe lehet a sejtosztódást követően a réskapcsolatok gyors helyreállításában (161, 162).

2.7.3 A connexin csatornák molekulatranszportjának szabályozása

A csatornák működése szelektív feszültség- és kémiai szabályozás alatt áll, illetve az áteresztőképesség is függ a connexinek izotípusától (139, 140, 163). Például a Cx43- és Cx32-csatornákat összehasonlítva előbbinek 10–20-szoros áteresztőképessége volt adenozin-difoszfátra (ADP), glutamátra és glutationra, míg 100–300-szoros adenozin-trifoszfátra (ATP) (164). A Cx32-csatornák ugyanakkor tízszeres szelektivitást mutattak adenozinra. A connexonok ionszelektivitása is különbözött, pl. a Cx32-csatornák az anionokra, a Cx40 és Cx43 a kationokra mutattak preferenciát (165-167).

A réskapcsolatok csatornái záródni képes pórusok, amiért Cx43-ban „golyó-lánc" módon a CT és CL szakaszok interakciója felel (168), míg a Cx26 esetében, melynek rövid a CT régiója, az NT és M1 domének kölcsönhatása (169). A csukódást a transzjunkcionális és transzmembrán feszültség, valamint az intracelluláris pH és kalcium-koncentráció változása is szabályozza (150, 170-172). Példának okáért ez védi az apoptotikus sejtekkel szomszédos sejteket, hogy kevésbé jusson át beléjük a programozott sejthalált kiváltani képes kalciumion.

A réskapcsolatok működésének ugyancsak fontos szabályozója a connexinek foszforilációja, melynek célpontjai rendszerint a CT régióban találhatók (173, 174). Bizonyos foszforilációk a csatornák záródását vagy internalizációjukat okozzák, mások a nyitásukat és összekapcsolódásukat a szomszédos sejtekkel. Általánosságban a Cx43 csatornafunkcióját a kazeinkináz-1 és a proteinkináz A (PKA) fokozza, míg a

proteinkináz C (PKC), MAPK, Src (sarcoma) kináz és a sejtciklus-szabályozó CDK1 gátolja (175). S-nitroziláció során nitrogén-monoxid kapcsolódik egy cisztein (C) tiol oldalláncához, amit connexinek esetében is kimutattak (176). Pl. a Cx43 nitrozilációját érfal myo-endothelialis junkciójában figyelték meg, mely a csatornák nyitott állapotát segítette elő, kommunikációt biztosítva a két sejttípus között (177). Egyes connexinek funkcionális szabályozásában a fentieken kívül karboxilációt, hidroxilációt és SUMOilációt (SUMO: „small ubiquitin-like modifier") is megfigyeltek (176, 178).

2.7.4 Connexin félcsatornák, csatornafüggetlen funkciók

A connexonok nemcsak a szomszédos sejteket összekapcsoló réskapcsolatként, hanem az extracelluláris térbe nyíló ún. félcsatornákként („hemichannel") is funkcionálhatnak, pl. parakrin szignálokat [ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP), ATP, Ca^{2+}] közvetíthetnek (139, 140, 179), így szerepet játszva kalciumhullámok propagálásában (pl. astrocyták vagy osteoblastok és osteoclastok között (180, 181)), vagy ATP kiáramlás révén gyulladásos reakció kiváltásában (182). Működésüket a sejthalál különböző típusai során is megfigyelték.

A connexinek csatornafunkciótól független folyamatokban is részt vesznek, pl. gátolhatják a proliferációt (183), szabályozhatják a sejthalált és migrációt (184). A connexinekkel (elsősorban azok CT régiójával) intracelluláris kapcsolatban álló félszáz fehérjére, mint „gap junction proteome"-ra vagy „connexin interactome"-ra hivatkoznak (185, 186). Többek között citoszkeletális, sejtadhéziós és intracelluláris transzport fehérjék, proto-onkogének és tumorszuppresszorok tartoznak ebbe a proteomba (142, 186-189). A connexinek további, szerteágazó szerepét illusztrálja, hogy a sejtmagban a Cx43 transzkripciós faktorként vagy a sejtciklus közvetlen szabályozójaként is viselkedhet (185, 190), vagy hogy a mitokontriumok belső membránjában elhelyezkedő Cx43 félcsatornák a kálium- és kalciumáramlást biztosítják a sejtorganellum működése során (191-193).

2.7.5 Connexin mutációk következményei

Mivel a connexinek szinte valamennyi sejtben megtalálhatók, szerepük sokrétű és jórészt feltáratlan, így csak néhány kiragadott példát említek. Főbb élettani funkcióikra a mutációik okozta betegségek klinikai képe világít rá (**2. táblázat**). A Cx43/GJA1

mutációi egyrészt a koponyacsontok, fogak, szemek, ujjak, hosszú csöves csontok fejlődési rendellenességeit, másrészt bőrelváltozásokat, harmadrészt pitvarfibrillációt vagy bölcsőhalált okozhatnak (194-196). Ezek alapján igazolták e connexin izotípus szerepét az osteoblastok differenciációjában (197), a bőrhám integritásában (198) és a szív ingerületvezetésében (145). A Cx40/GJA5 defektusa ugyancsak pitvarfibrillációhoz vezethet.

A legtöbb connexin-mutáció okozta betegség változatos bőreltérésekkel jár (199). Például az erythrokeratodermia variabilis et progressiva nevű betegséget hyperkeratosis valamint átmeneti erythema jellemez, és a korábban említett Cx43-on kívül a Cx31/GJB3 és Cx30.3/GJB4 mutációi is kiválthatják (196). Az epidermis connexinjei részt vesznek a rétegek közötti kalciumgradiens fenntartásában (Cx26/GJB2), mely befolyásolja a lipidszekréciót és a víz-barrier funkciót, de szerepüket a sebgyógyulás során is megfigyelték (196, 198).

A Cx26, Cx30/GJB6 és Cx31 mutációi bőrtüneteken kívül akár süketségig romló halláskárosodást is okozhatnak. A belsőfülben a connexinek szerepet játszanak a hártyás csiga endolymphájában jelen lévő magas káliumion-koncentráció szabályozásában, valamint a Corti-szerv sejtjeinek védelmében és táplálásában (194, 196).

A Cx32/GJB1 mutációja demyelinisatiós perifériás neuropathiákkal, esetleg hallóideg-károsodással, a Cx30.2/GJC3 defektusa ugyancsak neuropathián alapuló halláskárosodással, a Cx47/GJC2 mutációja pedig leukodystrophiával (a fehérállomány degenerációja, következményes mozgászavarokkal, görcsös bénulásokkal) vagy más esetben lymphoedemákkal jár. Mind a perifériás Schwann-sejtek, mind a központi idegrendszeri oligodendrocyták expresszálják a Cx32-t és Cx30.2-t, valamint utóbbiak a Cx47-et is. A Cx32-réskapcsolatok a feltekeredett gliasejt-rétegek között biztosítják kis molekulák gyors transzportját. Rágcsálókban a velőshüvely belső lemezében elhelyezkedő Cx29 (a humán Cx30.2 ortológja) az ideg axonjának $K_V1.1/K_V1.2$ kálium-csatornáival van összekapcsolódva, és a repolarizáció gyorsításával az ingerületvezetést segíti (200, 201). A Cx47-nek szerepe lehet a nyirokerek billentyűinek megfelelő kifejlődésében is (202).

A Cx46/GJA3 és Cx50/GJA8 defektusa szürkehályoggal járhat, e connexineknek ugyanis fontos szerepük van az avaszkuláris szemlencse-sejtek homeosztázisának fenntartásában (194).

Látható tehát, hogy a connexincsatornák defektusai olyan „kiszolgáltatott", izolált szövetekben a legkritikusabbak, ahol a sejtek környezetükkel való kapcsolata (kommunikáció, tápanyagforgalom) korlátozott, és nagy mértékben függ e réskapcsolatok működésétől (pl. vastag epidermis-réteg, idegek körül felcsavarodott myelin-hüvely, avaszkuláris belsőfül-területek és szemlencse).

2.7.6 „Bystander" hatás közvetítése szomszédos sejtekbe

A szív réskapcsolatai az ingerületvezetésen kívül a sejtkárosodást is képesek propagálni ischaemia és infarktus során, a sejtkárosodásból származó metabolitok szétterjesztésével („spreading depression") (203). A réskapcsolatok kísérletes gátlásával az infarktus kiterjedését csökkenteni lehetett. A sejtkárosító anyagok réskapcsolatok általi közvetítését („bystander" hatás) a jövőben talán terápiásan is ki lehet használni (204, 205). Connexin csatornák jelenlétében a retrovírus vektorral indukált herpes simplex timidin kinázt expresszáló daganatsejtek nukleozidanalóg ganciklovirral kezelve elpusztultak, s e pusztulás a szomszédos sejtekre is átterjedt. Tumorok kemo- és sugárterápia során ugyancsak megfigyeltek hasonló „bystander" hatást (147).

2.7.7 Deregulált connexin csatornák lehetséges szerepe daganatokban

A connexinek daganatokban betöltött szerepe az eddigi megfigyelések alapján szintén sokrétű. Noha connexin gének mutációját mindeddig nem írták le daganatokban, expressziós és funkcionális változásaikat megfigyelték. Először tumorszuppresszor tulajdonságaikra figyeltek fel, például a sejtnövekedés gátlása vagy az apoptózis serkentése révén (206, 207). A kémiai tumorpromoterek és proliferatív szignálok (RAS, RAF, Src) gátolták a réskapcsolatokat, míg a tumorszuppresszor gének és a retinoid kezelés serkentette azokat (207, 208). Connexin-deficiens transzgenikus egereket fokozott daganatképződés jellemzett, pl. Cx32 hiányakor hepatocellularis carcinoma, Cx43-hiányban tüdőrák vált gyakoribbá (209-211). A connexinek proliferációgátló hatásukat részben a sejtciklusra fejtik ki: pl. a Cx43 indukciója osteosarcoma sejtekben a CDK-gátló $p27^{KIP1}$ magasabb szintjével vagy hepatocellularis carcinomában a cyclin D1

csökkenésével járt együtt (212, 213). A connexineknek ugyanakkor a daganatokat támogató szerepük is lehet, pl. az EMT elősegítésével vagy a tumorsejtek (pl. melanoma, emlőrák, glioma) és endothelsejtek közötti réskapcsolatok révén az ereken való áthaladás támogatásával (210, 214-216). Áttéti daganatokban is megfigyelték a connexinek re-expresszióját, pl. heterotípusos réskapcsolatot mutattak ki emlőráksejtek és osteoblastok között, vagy gyomorráksejtek és mesothelialis sejtek között, aminek a csont- illetve peritonealis metasztatizálás során lehet szerepe (217, 218). Agyi áttétek esetén az astrocytákkal kialakított réskapcsolat segítheti a daganatok túlélését [pl. ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szignál vagy kis nem kódoló ribonukleinsavak (RNS) közvetítésével], és felelhet a kemorezisztenciáért is pl. a Ca^{2+} elvezetésével, az apoptózist gátolva (148, 219-221). Kimutatták réskapcsolatok szerepét a gliomák agyi inváziójában is, valamint, hogy a Cx43 a citoszkeletonnal együttműködve segítette a sejtmotilitást (216, 222, 223). Daganatőssejtekben a többi tumorssejttől eltérő Cx-mintázatot figyeltek meg pl. glioma (alacsony Cx43, magasabb Cx46 expresszió), hepatoma (cytoplasmaticusan felhalmozódott Cx32) vagy tripla-negatív emlőrák (magasabb Cx26) esetében, és kísérletes manipulálásukkal az őssejtfunkciójuk zavart szenvedett (185, 193). Tumorsejtek és az immunrendszer sejtjei közötti „gap junction" kapcsolatoknak az antigénprezentációban, gyulladásos reakció kiváltásában, és daganatellenes hatások (pl. tumorszuppressziót előidéző mikro-RNS-ek) közvetítésében lehet szerepe.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai bizonyították, hogy a Cx43 expresszió és csatornafunkciók pozitív korrelációt mutatnak az óriássejtes csonttumor kimenetelével (224). A tumorok agresszivitásával párhuzamosan a neoplasztikus sejtekben a Cx43 foszorilációja hiányos volt, a fehérje csökkenő mértékben jutott a sejtmembránba, így a csatornafunkciók jelentősen károsodtak. Emlőcarcinomában immunhisztokémiai vizsgálatokkal, valamint *in silico* „messenger" RNS (mRNS)-expressziós chipekből nyert adatok elemzésével úgy találtuk, hogy adjuvánsan kezelt pácienseknél a Cx43 fehérje expressziója pozitív, míg a Cx30-expresszió negatív prognosztikus faktor lehet (225, 226). Neoadjuvánsan kezelt betegeknél pedig a terápia hatására csökkenő Cx26- és növekvő Cx46-expresszió kedvező prognosztikai alcsoportokat különített el. Kísérletesen, fej-nyaki laphámráksejtekben a fokozottabb Cx43-expresszió fokozottabb paclitaxel-érzékenységgel járt együtt (227), míg fej-nyak daganatos betegek klinikai anyagaiban vizsgálva kedvezőbb túlélési idővel társult (228).

2.7.8 Connexin csatornák az epidermisben és melanomában

A connexin kommunikációs csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak az epidermális funkciók koordinálásában, amit a bőrben expresszálódó számos connexin izotípus (Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx37, Cx45, Cx30, Cx26, Cx43) és a mutációikkal járó öröklődő bőrszindrómák is kihangsúlyoznak (198, 199). Ezidáig két izotípus, a Cx43 és Cx26 szerepét igazolták az epidermális keratinocyták és környező melanocyták közötti direkt metabolikus kapcsolat biztosításában (229). Noha vannak kísérleti adatok a connexinek szerepére a melanoma kialakulásának és metasztatikus inváziójának szabályozásában, a melanocytás tumorprogresszióra vonatkozó vizsgálatok klinikai esetekben hiányosak. A legtöbb közlemény a Cx43-at ismerteti, mely vagy hiányzik, vagy szignifikánsan csökken melanomában (230-233) s így hozzájárul a daganatnövekedés és -pusztulás feletti kontroll elvesztéséhez és az áttétképzéshez. Funkcionális vizsgálatok egy „gap junction”-hiányos egér melanoma modellben (B16-BL6) kimutatták, hogy a Cx43 forszírozott expressziója helyreállította a közvetlen sejtközötti kapcsolatot, illetve csökkentette a daganatsejt-proliferációt és a kitapadás-független növekedést („anchorage-independent growth”) (229). A növekedésgátlást *in vivo* is megerősítették csirke chorioallantois membránba ültetett daganatokkal. Hasonlóan, a Cx43 overexpressziója egy humán melanoma sejtvonalban (FMS) elősegítette a tumor nekrózis faktor alfa-mediált apoptózist, valamint xenograft modellben redukálta a tüdőáttétek számát és méretét is (234). További connexin-izotípusokat is azonosítottak, azonban tisztázatlan funkciókkal. A Cx26-ot vestibularis melanocytákban, valamint a bőrmelanoma epidermális és dermális mikrokörnyezetében (endothelialis és stromalis sejtekben) mutatták ki (230, 231, 235, 236). A Cx26 (a Cx43 mellett) jobban csökkent amelanotikus, mint a kevésbé agresszív melanotikus kutya oralis melanomában (237). Fokozott Cx30 expressziót a melanomák epidermális mikrokörnyezetében figyeltek meg (230, 231). További bizonyíték a connexinek szerepére a pigmentsejtek működésének szabályozásában, hogy zebrahalban (*Danio rerio*) a bőrmintázatot befolyásolni lehetett indukált gja5b (Cx41.8 - az emlős GJA5/Cx40 ortológja) mutációval, pl. a melonophore és xantophore sejtek eloszlásának megváltozása révén, melyek mindketten expresszálták ezt a connexin-izotípust (238, 239). A fejlődéstanilag a melanocytákkal közeli rokonságban álló, dúcléc eredetű Schwann-sejtekben Cx43-at, Cx32-t, Cx46-ot és Cx29-et (Gjc3 – a humán Cx30.2 ortológja) mutattak ki (240).

Munkacsoportunk a fenti connexin izotípusokon kívül a Cx32 és Cx30.2 expresszióját írta le melanocyta eredetű neoplasztikus elváltozásokban (241).

2.8 A sejtciklus és connexinek kapcsolata

A connexinek a sejtproliferációt általában gátolják, de serkenthetik is, elsősorban a növekedési jelútvonalakkal vagy korai sejtciklus-szabályozókkal kapcsolatba lépve (185, 193, 242). A legtöbb megfigyelést daganatsejteken végezték. A tumorszuppresszió végbemehet „gap junction" csatornák közvetítésével, pl. ép mikrokörnyezeti sejtekből a daganatsejtekbe proliferációgátló mikro-RNS-ek átjuttatásával (ezt makrofágok és májráksejtek, valamint csontvelői stromasejtek és emlőráksejtek között figyelték meg) (243, 244); más esetben viszont egyértelműen csatornafüggetlen mechanizmus zajlik, pl. a Cx43 egy csonkolt változata (GJA1-11k) a sejtmagban helyet foglalva gátolta a sejtciklus S-fázisba való átmenetét (245).

2.8.1 Növekedési útvonalak és connexinek kapcsolata

Gliomasejtekben a Cx43-hoz együttesen kapcsolódott az Src protoonkogén és annak inhibitorai („C-terminal Src kinase" és PTEN), ami az Src inaktiválódásához, következményesen a PTEN szintjének növekedéséhez és az Akt inaktivációjához vezetett (185, 246). Veseráksejtekben a Cx32 proliferációgátló hatását írták le a HER2 („human epidermal growth factor receptor 2") blokkolása (247), hepatomasejtekben pedig azt Akt gátlása révén (248). Más megfigyelések szerint azonban májráksejtekben a sejtplazmai Cx32 (249) vagy tüdőráksejtekben a Cx30.3 (250) az Src aktivitását fokozta, ami előbbi esetben az EGFR-jelútvonalat serkentette, és apoptózisgátláshoz vezetett. A malignitást támogató funkcióval összefüggheet a connexinek intracelluláris elhelyezkedése (251). Tüdőráksejtekben a cytoplasmaticus Cx26 a PI3K/Akt növekedési útvonalat serkentette, valamint EMT-t indukált (252). A Cx47 izotípus oligodendrocyta progenitorokban szerepet játszott az ERK1/2 foszforilációjában, és fokozta a sejtosztódást (253).

A Wnt jelutak és connexinek kapcsolatáról bővebb irodalom áll rendelkezésre (254). Általánosságban a sejt-/szöveti fejlődés során (pl. szívfejlődési modellekben (255)) a kanonikus Wnt útvonal a connexinek expresszióját fokozza, aminek a morfogenezisben és differenciálódásban van szerepe; később viszont, az érett sejtekben a connexinek a

kanonikus Wnt-útvonal gátlójává válnak, szabályozzák a homeosztázist, és tumorszuppresszor hatást fejtenek ki. Embrionális vesesejttenyészetben a Cx43 és N-cadherin együttes overexpressziója gátolta a Wnt/β-catenin/TCF („T-cell factor") útvonalat, fokozta a $p21^{WAF1/CIP1}$ expressziót és korlátozta a sejtproliferációt (256). Colorectalis ráksejtekben ugyancsak megfigyelték a β-cateninnel ko-lokalizálódó Cx43 Wnt jelútra kifejtett gátló hatását (257). Feltételezik, hogy míg korai emlőrákban a connexinexpresszió csökkenése a kanonikus Wnt útvonal aktiválódásával jár, előrehaladott betegségben az aberráns Wnt/β-catenin jelút connexin expressziót indukál, ami a migrációt és áttétképzést segíti (254, 258, 259). A nem-kanonikus Wnt útvonalak is kapcsolatban állnak a connexinekkel, szabályozva a „gap junction" funkciót és a citoszkeleton működéseit (254).

2.8.2 Setciklisszabályozók és connexinek kapcsolata

A Cx43 és más connexinek gyakran a $p27^{KIP1}$ és $p21^{WAF1/CIP1}$ CDK-gátlók közvetítésével gátolják a sejtciklust (260). Pl. Cx43 „gap junction"-ök az intracelluláris cAMP szint fokozásával vezethetnek a $p27^{KIP1}$ felhalmozódásához (213), a Cx50 a $p27^{KIP1}$ lebomlását akadályozza (261), de a Cx32 overexpressziója is a $p27^{KIP1}$ és $p21^{WAF1/CIP1}$ felülregulációját eredményezi (262), valamint ez a connexin izotípus a p53 aktivitását is fokozza (248).

A Cx43 a cyclin D1 és cyclin E1 degradációja révén (263), illetve a Hsc70 („heat shock cognate protein 70") megkötésével a cyclinD1-CDK4-$p27^{KIP1}$ komplex sejtmagba jutását gátolva is képes akadályozni a sejtciklus G1/S fázisátmenetet (264). Cyclin D1-gátló hatást írtak le Cx32 (248), cyclin D3-gátlást Cx31.1 (265) esetében is. Egér vaszkuláris simaizomsejtekben viszont a MAPK által foszforilált Cx43 a cyclin E-hez kötődve serkentette a PDGF („platelet-derived growth factor")-mediált sejtproliferációt (266).

A sejtciklus poszt-G1 fázisaiban a connexinek működését ritkábban figyelték meg. Emlő epithelialis sejtekben a Cx43 szerepét írták le a sejtpolaritás szabályozásában, és a mitotikus orsó orientálásában (267). Noha a legtöbb connexin a sejtciklus során záródott vagy internalizálódott, egy vizsgálatban megfigyelték, hogy a HeLa méhnyakráksejtekbe transzfektált Cx26 réskapcsolatokat képzett a G2/M-fázisok során is, melyen keresztül a

cAMP szétoszlott a szomszédos sejtek felé, a PKA aktivitását csökkentve, ezáltal a proliferációt lassítva (193, 268).

A fenti példákból körvonalazódik, hogy a connexinek proliferációra kifejtett hatása függ az adott sejt típusától, a benne működő jelátviteli utaktól, a sejt mikrokörnyezetétől, de az adott connexin izotípusától, és szubcelluláris elhelyezkedésétől is. A legtöbb megfigyelésben azonban közös, hogy a szabályozó hatás (legyen bármely irányú is), a sejtciklus G0 és G1 fázisaiban érvényesül.

3 Célkitűzések

A sejtproliferáció mértéke gyakran arányos a tumorok agresszivitásával, azonban az általános sejtciklus markerek pl. Ki67 kimutatása nem ad információt a daganatproliferáció dinamikájáról. A connexinek és az általuk alkotott réskapcsolatok szerepét a sejtek közötti homeosztázis szabályozásában, illetve daganatokban tumorszupresszorként vetették fel, azonban melanomákban eddig csak sporadikus információk voltak hozzáférhetők. Ezért a közönséges naevus – dysplasticus naevus – vékony melanoma – vastag melanoma – melanoma metasztázis tumorprogresszió során tanulmányoztuk:

1. a sejtciklusfrakciók megoszlását a G1, S-G2, ill. G2-M fázisokra jellemző fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával,

2. külön figyelmet fordítva a dysplasticus naevusok és vékony melanomák közötti elkülönítésre használható markerek, ill. markerkombinációk kutatására, mivel ez gyakran komoly differenciáldiagnosztikai kihívás;

3. a GEO adatbázisban a melanocytás neopláziák connexin-génexpressziójára vonatkozó releváns vizsgálatok *in silico* adatait;

4. melanoma sejtvonalakban és melanocyta tenyészetekben a connexin izotípusok expresszióját *in vitro* mRNS és fehérje szinten, valamint a réskapcsolat-csatornafunkciókat;

5. a releváns connexin izotípusok *in situ* expresszióját immunhisztokémiai módszerrel, saját klinikai-diagnosztikus tumorszövetekben.

4 Módszerek

4.1 Connexin izotípusok expressziójának in silico *analízise melanocytákban és melanocytás neoplasiákban*

A USA (Amerikai Egyesült Államok) NIH keretein belül a „National Center for Biotechnology Information" szervezet által működtetett, nyilvánosan elérhető Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) tanulmányoztuk a humán melanocytás daganatok biopsziás mintáiban mért és közölt, a connexin izotípusok génexpressziójára vonatkozó adatokat. Olyan vizsgálatokat válogattunk be, melyek többféle melanocytás elváltozást tartalmaztak (naevusok vs. melanomák, primer vs. áttéti melanomák), így lehetőséget biztosítottak azok összehasonlítására, valamint melyek a több connexin-gént is tartalmazó Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 illetve U133A gén-chipeket használtak (**3-4. táblázat**). A génexpressziós adatokat normalizációt követően a GCRMA („Guanine Cytosine Robust Multi-Array Analysis") gén-chip algoritmussal, az átlagos expressziós értékek figyelembevételével az SPSS szoftvercsomag (IBM, Armonk, NY, USA). alkalmazásával, párosítatlan t-próbával vizsgáltuk. A „fold-change"-et $p<0{,}001$ esetén tekintettük szignifikáns különbségnek.

3. táblázat. Connexin-génpróbák száma a vizsgált Affymetrix Human Genome chipekben.

Connexin gén	Connexin fehérje	Affymetrix Human Genome U133A	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GJA1	Cx43	1	1
GJA3	Cx46	1	0
GJA4	Cx37	2	3
GJA5	Cx40	1	2
GJA8	Cx50	1	1
GJA9	Cx59	1	1
GJA10	Cx62	0	1
GJB1	Cx32	1	1
GJB2	Cx26	0	1
GJB3	Cx31	3	3
GJB4	Cx30.3	1	1
GJB5	Cx31.1	1	2
GJB6	Cx30	0	1
GJC1	Cx45	1	5
GJC2	Cx47	2	2
GJD2	Cx36	1	1
GJD3	Cx31.9	0	2
GJD4	Cx40.1	0	1

4. táblázat. Különböző melanocytás elváltozások száma a GEO-adatbázisban általunk elemzett vizsgálatokban.

GEO azonosító	Platform	Anyag	Hivatkozás
GSE3189	Affymetrix Human Genome U133A	klinikai; 18 naevus, 45 melanoma	(276)
GSE7553	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0	klinikai; 2 *in situ*, 14 primer, 40 áttéti melanoma	(277)
GSE8401	Affymetrix Human Genome U133A	egér xenograft modell; 31 primer, 52 áttéti melanoma	(278)

4.2 Melanoma sejtvonalak és melanocyta kultúrák

A humán invazív melanoma sejtvonalakat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének tumorbankjából gyűjtöttük. Az A2058 agyi metasztázisból származik (269), a HT199 tüdőbe és májba áttétet adó melanomából (270), a WM983/A pedig egy vertikális növekedési fázisú daganatból (271, 272). A sejteket 5%-os magzati borjúszérummal („fetal bovine serum", FBS) és 1%-os gentamycinnel kiegészített RPMI 1640 médiumban (PAN-Biotech, Aidenbach, Németország) tenyésztettük.

Az epidermális melanocytákat a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján izolálták, korábbi közleményekben részletesen ismertetett módon (273-275). A sejteket plasztikai műtéten átesett egészséges személyek emlőjének vagy törzsének bőréből nyerték, a páciensek tájékoztatást követő beleegyezésével. A felhámot a hámtól 4 °C-on, 48 óráig, grade-II-es diszpáz oldattal (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) majd 37 °C-on, 20 percig, 0,25%-os tripszinnel kezelve választották el. A mintát 100 µm-es nejlonhálón (BioDesign, Saco, ME, USA) szűrték át, 4 °C-on, 10 percig, 200 g-n centrifugálták, majd 2–4 x 10^5 sejt/cm^2 denzitással 75 cm^2-es tenyésztő edénybe telepítették őket, „Mel-mix" médiumban, amely egyenlő arányban tartalmazott 2,5 ng/ml EGF-t, 25 µg/ml marhahipofízis-kivonatot („bovine pituitary extract"), 1%-os L-glutamint, 1%-os gentamycint és 2,5%-os FBS-t tartalmazó AIM-V, szérummentes lymphocyta- és keratinocyta-médiumot. Ebben a közegben a melanocyták 24 órán belül letapadtak, míg a keratinocytáknak ehhez 24–48 órára lett volna szükségük.

Így a tenyésztő edénybe helyezést követően 12–24 órával az utóbbi, még szuszpenzióban lévő sejteket le lehetett öblíteni. A melanocyták kiszelektálását az első passage-nál 0,01% tripszin-0,05% etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) oldattal való emésztéssel javították, mely a pigmentsejteket korábban felszedte, mint a hámsejteket. A melanocyták a 90%-os konfluenciát 7–9 nap alatt érték el. Eredetüket a „tyrosinase-related protein-1" expresszió igazolta.

Valamennyi sejttenyészetet 37 °C-on, 5% széd-dioxidot tartalmazó, párásított légtartalmú kamrában növesztettük. A tápoldatot 2–3 naponta cseréltük, a sejteket 90%-os konfluenciánál passzáltuk. A reagenseket a Life Techologies-től (Thermo-Fisher Scientific, TS Labor, Budapest) szereztük be, kivéve ahol másként jelzem.

4.3 RNS-izolálás, cDNS-átírás, valós idejű PCR

A sejttenyészetekből az RNS-t RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen, Venlo, Hollandia) izoláltuk. A sejteket 75 cm^2-es flaskákban ~90%-os konfluenciáig növesztettük, majd tripszin-EDTA-val felszedtük, kétszer 300 g-n 10 percig centrifugáltuk, 0,05 M-os foszfát-pufferelt sóoldatban („phosphate-buffered saline", PBS) szuszpendáltuk, ezután jégen tároltuk. A lízist 600 µl RLT pufferrel végeztük, majd a lizátumot 600 µl 70%-os etanolban szuszpendáltuk, spin oszlopra töltve 8000 g-n 30 másodpercig centrifugáltuk, majd 350 µl RW1 mosó puffert mértünk rá. A DNS eltávolításához 70 µl RDD puffer és 10 µl DNáz törzsoldat („DNase stock solution") elegyét adtuk a mintákhoz, amiben 24 °C-on 20 percig inkubáltuk, majd 350 µl RW1 pufferrel, ezután 500 µl RPE pufferrel centrifugáltuk. Végül az oszlopokat steril Eppendorf-csövekbe helyeztük, 50 µl RNáz-mentes vízzel, 24 °C-on 2 percig inkubáltuk, majd 1 percig centrifugáltuk, összegyűjtve az eluált, tisztított, teljes RNS mintát. Az RNS-koncentrációt 260 nm-en, NanoDrop ND-1000 UV-Vis spekrofotométerrel (NanoDrop Tech., Houston, TX, USA) mértük meg, 260 nm-en megállapított abszorpciós érték alapján.

A reverz transzkripcióhoz High Capacity cDNA Revers Transcription Kit-et (Thermo-Fisher, Applied Biosystems) használtunk. 1 µg teljes RNS mintát 2 µl tízszeres RT pufferrel, 2 µl random primer oldattal és 0,5 µl dNTP (dezoxinukleotid) oldattal kevertük, majd 19 µl-re egészítettük ki nukleázmentes vízzel. A mintákat 70 °C-on, 5 percig denaturáltuk, és 4 °C-ra hűtöttük, Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR (polimeráz

láncreakció, „polymerase chain reaction”) készülékben (Thermo-Fisher, Applied Biosystems), majd 1 µl reverz transzkriptáz polimeráz oldattal egészítettük ki. A cDNS (komplementer DNS) szintézishez, a mintákat 42 °C-ra hevítettük 1 órára (anelláció, szintézis), majd 85 °C-ra 10 percig (reverz transzkriptáz inaktivációja), végül 4 °C-ra hűtöttük és így tároltuk. A negatív kontrollokból vagy az enzim vagy az RNS hiányzott.

A reverz transzkripciós polimeráz-láncreakció („real-time quantitative reverse transcription PCR”, qRT-PCR) során TaqMan próba alapú detektálást alkalmaztunk, hogy kvantifikálhassuk a connexin izotípusok expresszióját az ACTB (β-actin) háztartási („housekeeping”) génjéhez viszonyítva. A komplementer DNS szál szintézise során a primerpár által közrefogott DNS-szakaszhoz hibridizált TaqMan próba lebomlik, így a hozzá kapcsolt fluoreszcens festék („reporter”) és ennek fluoreszcenciáját elnyelő „quencherer” molekula eltávolodik egymástól, a szintézist jelző jel detektálhatóvá, intenzitása mérhetővé válik. A primereket az IDT-től (Integrated DNA Technologies,

5. táblázat. qRT-PCR során használt, előgyártott primerek.

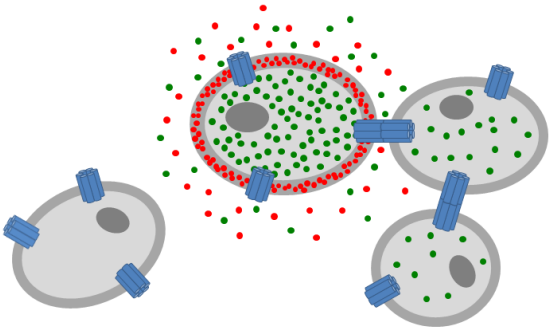
Gén	Primer
ACTB exon 1-2	Hs.PT.56a.22214847
GJA1 exon 1-2	Hs.PT.56a.38338544
GJA3 exon 1-2	Hs.PT.56a.28039214
GJA4 exon 1-2	Hs.PT.56a.987509
GJB1 exon 1-3	Hs.PT.56a.4848609
GJB1 exon 2-2	Hs00939759_s1
GJB1 exon 2-2	Hs04259568_s1
GJB2 exon 2-2	Hs.PT.56a.505396.g
GJB3 exon 2-2	Hs.PT.56a.39590773.g
GJB4 exon 1-2	Hs.PT.56a.26779601
GJB5 exon 1-2	Hs.PT.56a.321621
GJB6 exon 5-6	Hs.PT.56a.4153325.g
GJB7 exon 1-2	Hs.PT.56a.39266451
GJC1 exon 3-4	Hs.PT.56a.19845193
GJC2 exon 1-2	Hs.PT.56a.18725226
GJC3 exon 2-2	Hs.PT.56a.26377588.g
GJD2 exon 1-2	Hs.PT.56a.39459544
GJD3 exon 1-1	Hs.PT.56a.24558172.g
GJD4 exon 1-2	Hs.PT.56a.40171761

Skokie, IL, USA) szereztük be (**5. táblázat**). Minden mintával legalább három párhuzamos mérést végeztünk. Az Eppendorf PCR lemezek („plate”) nyílásaiba 5,25 µl nukleázmentes víz, 7,5 µl PCR Master Mix, 0,75 µl primer próba oldat és 1,5 µl cDNS elegye került. A lemezeket lefedtük, centrifugáltuk és 40 ciklus PCR-t végeztünk el velük. A reakciók hőprofilja: 50 °C-on 2 percig uracil-N-glikoziláz aktiváció, majd 95 °C-on 10 percig polimeráz aktiváció, ezt követően 40 cikluson át váltakozva 95 °C-on 15 másodpercig denaturáció és 60 °C-on 1 percig anelláció + extenzió (két lépéses PCR). Az adatokat a StepOne Plus v2.0 (Thermo-Fisher, Applied Biosystems) szoftverrel értékeltük ki.

4.4 Festéktranszfer-analízis

A szuszpenzióba felvett sejteket kettős fluoreszcens jelöléssel láttuk el, a membránfoszfolipidet permanensen jelölő, vörös színű 1,1’-dioktadecil-3,3,3’,3’-tetrametilindokarbocianin-perkloráttal (DiI, excitációs/emissziós csúcsa: 549/565 nm) és a membránon átjutó calcein-acetoximetilészterrel (calcein-AM), melyet az intracelluláris észterázok hidrofil, zöld színű calceinné alakítanak (molekulasúly: 0,6 kDa; excitációs/emissziós csúcs: 495/515 nm), ez utóbbi a sejtek közötti réskapcsolatokon képes közlekedni (**7. ábra**).

Minden mintából 2 x 10^{6} sejtet 1 ml PBS-ben szuszpendáltunk, és vagy 0,5 µM calcein-AM + 9 µM DiI elegyével vagy csak ezek egyikével mint kontrollokat jelöltünk. Ezután 37 °C-on 30 percig inkubáltuk őket, hogy kialakulhasson a hidrofil calcein (224). Ezt követően PBS-öblítés és centrifugálás után 10^{6} jelölt sejtet 300 µl PBS-ben szuszpendáltunk, majd ebből 10^{5} kettős jelölt sejtet 9 x 10^{5} jelöletlen sejttel elegyítettünk, és 37 °C-on 5 órán át, egy-egy 25 cm^{2}-es sejttenyésztő flaskában inkubáltunk, hogy konfluensen



7. ábra. A festéktranszfer-vizsgálatunk elméletének ábrázolása. A donor sejteket DiI (piros) és calcein-AM (zöld) festékekkel jelöltük. Előbbiek a plazmamembránt jelölték, utóbbiak a sejbe diffundáltak, ahol az intracelluláris észterázok hidrofil calceinné hasították őket. A calcein a réskapcsolatok közvetítésével (kék) jutottak át a kapcsolódó, jelöletlen sejtekbe. Balla Péter ábrája, az engedélyével felhasználva (224).

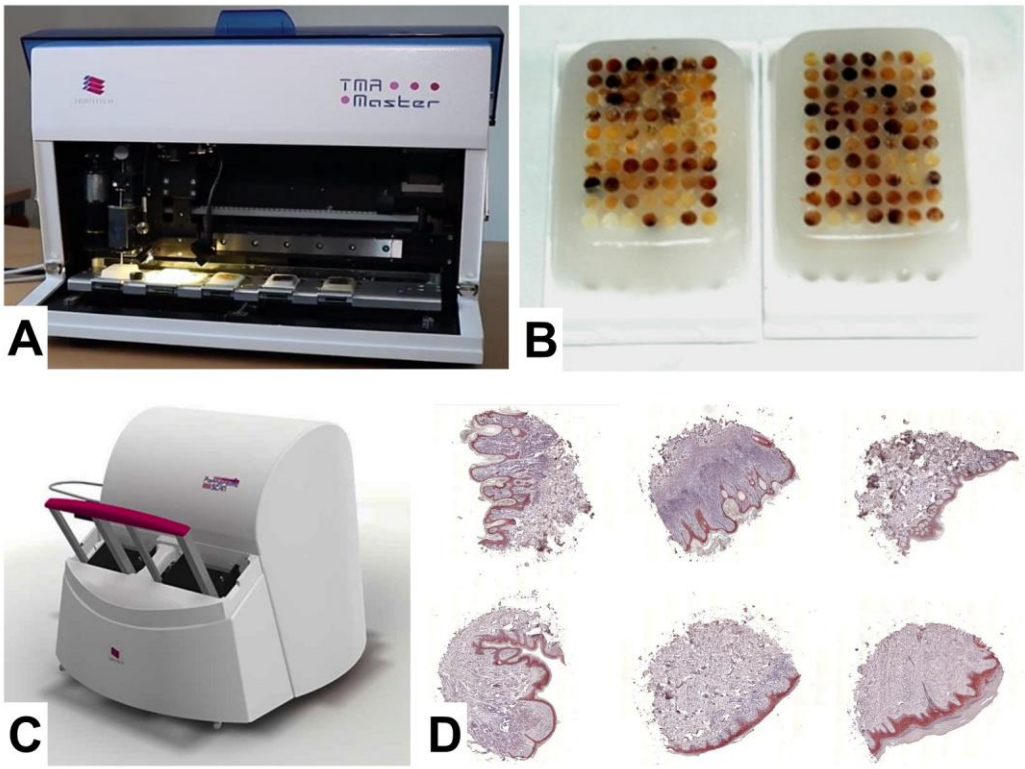
letapadhassanak, és kialakulhassanak a sejtközötti kapcsolatok. Ezt követően PBS-mosás után 0,01% tripszin-0,02% EDTA oldattal felszedtük a sejteket, öblítettük és centrifugáltuk őket, és 300 µl PBS-ben szuszpendálva mintánként 20000 sejtet számoltunk meg Navios áramlási citométerrel (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA). 488 nm-es lézerrel gerjesztve a calcein fluoreszcenciáját 530/30 nm-es, a DiI-ét 585/42 nm-es szűrővel detektáltuk. A DiI-pozitív sejtfrakció az eredetileg kettős jelölt sejteket reprezentálták, míg a csupán calcein-festődött sejtek a réskapcsolati kommunikációval arányban jöttek létre. A mérési eredményeket Kaluza szoftverrel (Beckman Coulter) értékeltük ki, kvadráns „dot plot" segítségével jelenítettük meg.

4.5 Melanocytás bőrelváltozások szövetmintái, szöveti multiblokk

19 közönséges (CN mint „common nevus"; 10 „compound", 8 intradermális és 1 halo) és 63 dysplasticus naevus (DN; 4 junctionalis, 46 „compound", 13 lentiginosus, másként 36 enyhe és 27 súlyos dysplasiat mutató), valamint 63 primer (PM; 23 „vékony" ≤ 1 mm és 40 „vastag" > 1 mm) és 22 áttéti melanoma (MMet; 6 nyirokcsomó- és 16 bőrmetastasis) 4%-os formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkját gyűjtöttük össze a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján 2003–2006 között kimetszett és diagnosztizált anyagok közül. Az alanyok átlagos életkora 37,3 (11–64) év volt CN (6 férfi, 13 nő), 34,3 (12–76) év DN (38 férfi, 25 nő), 64,4 (25–88) év PM (31 férfi, 32 nő) és 66,5 (43–87) év MMet (7 férfi, 15 nő) esetén. A PM esetek Clark-szint szerinti szöveti mélysége 18 esetben II, 29-ben III, 9-ben IV, 7-ben V volt. Vékony melanomák esetében az átlagos vastagság 0,672 (0,304–0,988) mm, az átlagos mitotikus index 2,9 (0–11) volt, vastag melanomák esetében pedig 5,199 (1,064–26,524) mm illetve 18,0 (0–71). A betegek adatait a Szegedi Tudományegyetem és a budapesti Semmelweis Egyetem hatályos etikai szabályzata szerint kezeltük. (Határozat száma: KL-37/2006).

A fenti anyagokból 1–3 darab, 2 mm átmérőjű szövethengert vágtunk ki, a reprezentatív területeket hematoxilin-eozinnal festett metszet alapján kijelölve. Nagyméretű léziókból külön-külön henger tartalmazta a vertikális tumorfrontot, valamint a daganat középső és felszínes régióját. Kétséges esetekben tapasztalt bőrpatológusokkal konzultáltunk (N. I. B. és V. E.). A szövethengereket 6 darab 70 mintás szöveti multiblokkba (TMA) gyűjtöttük, a számítógép-vezérelt TMA Master (3DHistech, Budapest) készülék

segítségével (**8/A-B. ábra**). A fent felsorolt esetszámok a sérült és nem reprezentatív minták kihagyását követően értendők, a sejtciklusfehérjék expresszióját vizsgáló munkánkban. A connexin-expressziós vizsgálatok során az egyik TMA-blokk már kevés mintát tartalmazott, így azt kihagytuk az értékelésekből. Az elemzésre alkalmas esetszámok az alábbiakra csökkentek: 16 CN, 58 DN, 49 PM (22 vékony, köztük 6 *in situ*, valamint 27 vastag) és 19 MMet (4 regionális nyirokcsomói és 15 bőráttét). Az átlagéletkor 33,8 (11–64) év volt CN (6 férfi és 10 nő), 34,3 (12–76) év DN (33 férfi, 25 nő), 63,7 (25–91) év PM (23 férfi, 26 nő) és 65,6 (43–87) év MMet esetén. A PM esetek Clark-szint szerint az alábbi számban szerepeltek: I: 6, II: 13, III: 20, IV: 7, V: 3. Vékony melanomáknál az átlagos vastagság 0,530 (0,157–0,988) mm, az átlagos mitotikus index 2,9 (0–11) volt. Vastag melanomáknál ezek az értékek 4,835 (1,064–15,806) mm illetve 14,9 (2–45) voltak.



8. ábra. 3DHistech TMA Master készülék (**A**) segítségével állítottuk össze a szöveti multiblokkokat (**B**). A blokkokból készült metszeteken végeztük el az immunhisztokémiát, melyeket ezután 3DHistech Pannoramic Scan készülékkel (**C**) digitalizáltunk, és számítógépen értékeltünk (**D**).

4.6 Immunhisztokémia és immuncitokémia

A fent említett TMA-blokkokból mikrotómmal 4 µm szeletvastagságú metszeteket készítettünk, melyeket adhezív tárgylemezekre (SuperFrost Ultra Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig, Németország/ Thermo-Fisher) vittünk, és a feldolgozásig hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltunk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteket xilolban és etanolban deparaffináltuk.

A sejtciklusos vizsgálatunkban az antigénfeltáráshoz a metszeteket pH 9,0 vegyhatású 0,01 M trisz-0,1 M EDTA (TE) pufferben, illetve a cyclin D1 vizsgálatához pH 6,0-os „target retrieval buffer" oldatban (Dako, Glostrup, Dánia) ~105 °C-on, 30 percig forraltuk elektromos kuktában (Avair Ida YDB50-90D, Biatlon, Pécs), majd az endogén peroxidázok blokkolására metanolban oldott 0,5%-os hidrogén-peroxid oldatban 20 percig inkubáltuk. Az indifferens fehérjék blokkolására a Novolink Polymer kit (Leica-Novocastra, Newcastle upon Tyne, Egyesült Királyság) megfelelő készítményét alkalmaztuk párásító kamrában, szobahőmérsékleten, 10 percig.

A connexines vizsgálatunkban a fent leírt peroxidázgátlás megelőzte a feltárást. Antigénfeltáráshoz a lemezeket TE pufferben, ~100 °C-on, 50 percig mikrohullámú sütőben hőkezeltük (Whirlpool JT 366, Benton Harbor, MI, USA), majd 0,005%-os tripszin-fenolvörös oldatban (Thermo-Fisher, Gibco) 10–20 másodpercig emésztettük. Az aspecifikus kötőhelyeket 5%-os BSA-TBST oldatban 30 percig kezelve gátoltuk.

A **6. táblázatban** felsorolt primer antitesteket mindkét vizsgálatban 1% szarvasmarhaszérum-albumin („bovine serum albumin", BSA) pH 7,4-es trisz-pufferelt sóoldatban („tris-buffered saline", TBS) oldottuk, velük a metszetek inkubálását párásító kamrában, szobahőmérsékleten, egy éjszakán át végeztük. Ezt követően a lemezeket a fent említett Novolink polimer-peroxidáz kit posztprimer blokkoló reagensével kezeltük 30 percig, majd a polimer reagenssel újabb 30 percig. Az inkubációs lépések között 2 x 3 percig öblítettünk 0,01% Tween-20-at tartalmazó TBS pufferben (TBST). Az enzimaktivitást hidrogénperoxid/3-amino-9-etilkarbazol szubsztrát-kromogén pH 4,5-es 0,1 M acetát pufferes oldatában tettük láthatóvá mikroszkópos kontroll mellett, 3–5 percig kezelve. A képződött piros színű csapadék jól elkülöníthető volt a szövetek barna melaninpigmentjétől. A metszeteket ezután hematoxilinnel magfestettük, majd Faramount vizes fedőanyag (Dako) használatával lefedtük.

6. táblázat. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt primer antitestek. A reagensek gyártói: abCam/Epitomics, Burlingame, CA, USA; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; Merck/Millipore, Burlington, MA, USA; Merck/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Thermo/Lab Vision, Kalamazoo, MI, USA, továbbiak a szövegben ismertetve.

Célantigén	Antitestklón	Gyártó, katalógusszám	Hígítási arány
aurora A	1G4 (nyúl)	Cell Signaling #4718	1:80
aurora B	EP1009Y (nyúl)	AbCam (Epitomics) ab45145 (1788-1)	1:300
CDK2	2B6 (egér)	Thermo (LabVision) MS-459-P0	1:300
cyclin A	6E6 (egér)	Thermo (LabVision) MS-1061-S0	1:150
cyclin D1	SP4 (nyúl)	Thermo (LabVision) MA1-39546	1:200
geminin	EM6 (egér)	Leica (Novocastra) NCL-L-Geminin	1:150
Ki67	MIB-1 (egér)	Dako IR626 (N1633)	1:2
MCM6	KAT82 (egér)	Leica (Novocastra) NCL-L-MCM6	1:400
topoizomeráz II alfa	Ki-S1 (egér)	Thermo (LabVision) MS-1819-S0	1:400
Cx43 (GJA1)	poliklonális (nyúl)	Cell Signaling #3512	1:100
Cx46 (GJA3)		Merck (Sigma-Aldrich) SAB1300557	1:75
Cx32 (GJB1)		Merck (Sigma-Aldrich) HPA010663	1:30
Cx26 (GJB2)		Merck (Millipore) AB8143	1:1000
Cx30 (GJB6)		Merck (Sigma-Aldrich) HPA014846	1:75
Cx30.2 (GJC3)		Merck (Sigma-Aldrich) AV36638	1:500

Az immuncitokémiához a tenyésztett sejteket 0,05 M TBS-sel átöblítettük, 0,01% tripszin-0,02% EDTA oldattal szuszpendált állapotba hoztuk, majd 8 lyukú tenyésztőlemezekbe (Falcon, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) helyezett fedőlemezekre passzáltuk, és ~75%-os konfluenciáig tenyésztettük. Ekkor a kultúrákat TBS-sel átmostuk, metanolban –20 °C-on 10 percig fixáltuk, megszárítottuk, és TBS-sel öblítettük. Párhuzamos mintákat 0,2%-os Triton-X-100 tartalmú TBST-ben permeabilizáltunk 10 percig, majd 4%-os formalinos TBS pufferben újabb 10 percig fixáltunk. Az aspecifikus kötőhelyeket 5%-os BSA TBS-beli oldatával 20 percig kezelve blokkoltuk, majd a primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk.

Az immunfluoreszcens vizsgálathoz a nyúl eredetű anti-connexin primer antitesteket egér eredetű anti-vimentin (V9 klón, 1:200; Dako), anti-Ki67 vagy Melan A (1:200; Dako) antitestekkel elegyítettük, hogy a sejtstruktúrát, proliferációt illetve a melanocyta eredetet láthatóvá tegyük. A primer antitesteket Alexa Fluor 488 illetve 546 konjugált kecske anti-egér (488) illetve anti-nyúl (546) IgG H+L szekunder antitestekkel (Thermo/Invitrogen)

kezeltük 90 percig, 1:200 hígításban TBST-ben oldva, majd a sejtmagot Hoechst festéssel (1:500; Merck/Sigma-Aldrich) jelöltük. Az inkubációs lépések között a lemezeket 3x2 percig TBST-vel öblítettük, végül a lemezeket fluoreszcens fedőanyaggal (Dako) tárgylemezre helyeztük.

A szövettani metszeteket Pannoramic Scan (3DHistech) mikroszkóppal digitalizáltuk (**8/C-D**), és a géphez tartozó szoftverrel, dermatopatológus segítségével megszámoltuk a reprezentatív területeken a pozitív tumorsejtek arányát. Ezek kategorizálására olyan skálákat határoztunk meg, melyek jól elkülönülő csoportokat hoztak létre (**7. táblázat**).

7. táblázat. Az immunhisztokémiai reakciók értékelése a pozitív naevus- illetve melanomasejtek arányát vizsgálva. Sejtciklus-markerek esetén a magi reakciót vettük figyelembe.

	0	**1**	**2**	**3**
cyclin D1, CDK2, MCM6, Ki67, $p16^{INK4a}$	< 1%	1–9%	10–29%	≥ 30%
cyclin A, geminin, Top2a, aurora A és B	< 1%	1–4%	5–19%	≥ 20%
Cx46, Cx26	< 10%	10–49%	50–74%	≥ 75%
Cx43, Cx32, Cx30.2	< 5%	5–24%	≥ 25%	

A vaszkuláris connexin-pozitivitás megállapításához kétfokozatú skálát használtunk: 0: ≤5% (negatív) és 1: >5% (pozitív), az epidermális keratinocyták értékelésére pedig Haass felosztását: 0: negatív; 1: stratum granulosum; 2: legfelső rétegek („uppermost layers”); 3: szuprabazális rétegek („suprabasal layers”); 4: minden réteg („all layers”) (230).

A melanocytás daganatok connexin-expresszóját összehasonlítottuk a sejtciklusproteineket vizsgáló munkánk adataival, kiegészítve a $p16^{INK4a}$ vizsgálatával (Ab6 klón, 1:400, Thermo/LabVision).

Az immunhisztokémiai reakciók statisztikai értékeléséhez dichotomizálást követően kétoldalas Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztunk (SPSS), a teoretikus szomszédos progressziós fokozatokat összehasonlítva, nevezetesen: naevus/melanoma illetve CN/DN, DN/vékony PM, vékony/vastag PM, vastag PM/MMet. A pozitívnak tekintendő immunreakció határértékének megállapításához minden lehetőséget kipróbáltunk (pl. 0/1–4, 0–1/2–4, 0–2/3–4, 0–3/4), szignifikáns eltérésnek a $p<0,05$ értéket tekintettük. Az

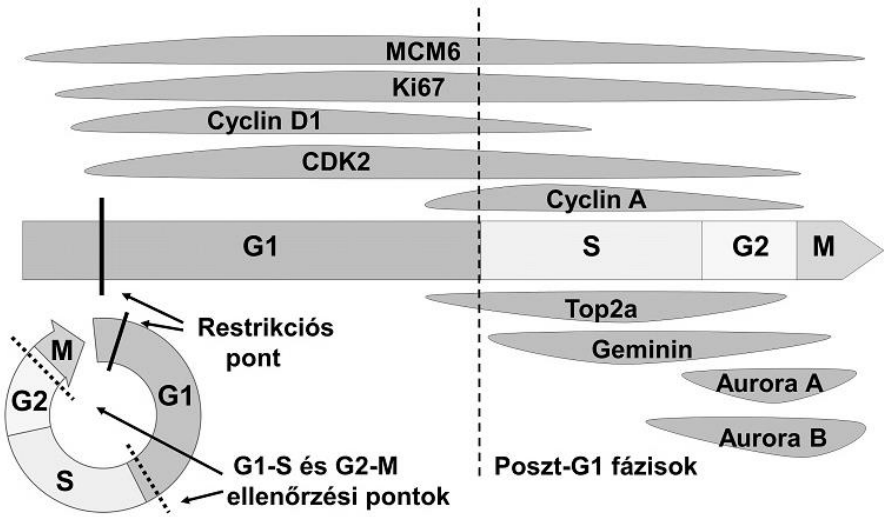
expressziós profilok és tumorprogressziós csoportok lehetséges korrelációját súlyozatlan hierarchikus klaszteranalízissel is elemeztük (R 15.2.0; R Foundation, Bécs, Ausztria).

A sejtciklusfehérjék expresszióját Spearman-féle rangkorrelációs analízissel is vizsgáltuk (Statistica, StatSoft, Tulsa, OK, US), ekkor $p<0{,}001$ értéket vettük szignifikánsnak, valamint a biomarkerek szenzitivitását illetve specificitását is értékeltük (SPSS), illetve diszkriminancia-analízist is végeztünk a biomarker-kombinációk prediktív értékének megállapításához, „leave-one-out” módszerrel keresztvalidálva.

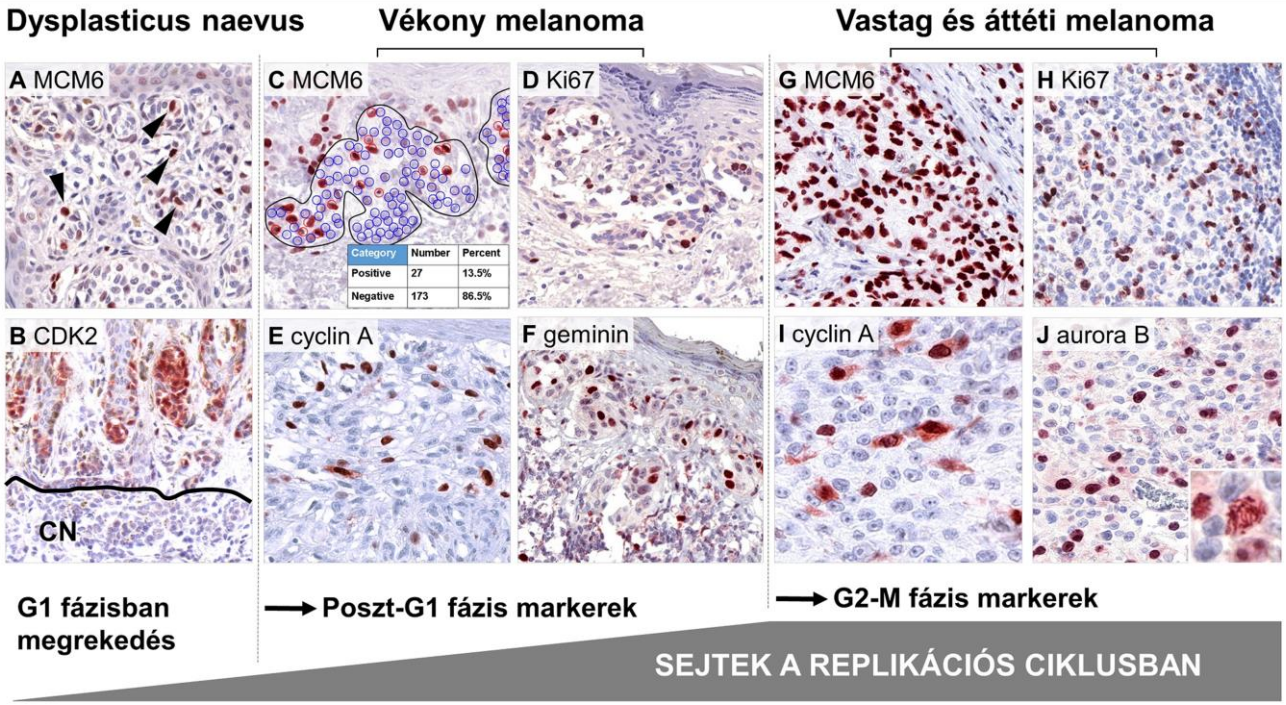
5 Eredmények

5.1 Sejtciklusfázisok progressziója melanocytás daganatokban

A sejtciklus-fázismarkerek eltérő fehérjeexpresszióját *in situ* vizsgáltuk, a közönséges naevus – dysplasticus naevus – vékony melanoma (≤ 1 mm) – vastag melanoma (> 1 mm) – áttéti melanoma sorozat mentén (**9–11. ábra, 8. táblázat**). Következtetéseinket akkor láttuk igazoltnak, ha a csoportok között legalább két határértéknél statisztikailag szignifikáns különbség volt. A közönséges naevusok alacsony szinten általános (MCM6, Ki67) és G1 fázismarkereket (cyclin D1, CDK2) expresszáltak, az utóbbiak dysplasticus naevusokban szignifikánsan megemelkedtek (p<0,001 – p=0,014). A poszt-G1 fázismarkerek, mint az S–G2 (cyclin A, geminin, Top2a) és G2–M (aurora A és B) fázisok szabályozói, a vékony melanomákban váltak kimutathatóvá, így szignifikánsan felülregulálódtak a naevusokhoz viszonyítva (p<0,001 – p=0,025). Az MCM6 és Ki67 expressziója ugyancsak szignifikáns emelkedést mutatott vékony melanomákban, a dysplasticus naevusokhoz viszonyítva. Vastag melanomákban a sejtciklus-progressziós markerek szignifikánsan felülregulálódtak a vékonyakhoz képest (p<0,001 – p=0,026), kivéve az MCM6-ot, cyclin D1-et és CDK2-t, ami a korai sejtciklusmarkerek állandó szintjére és a poszt-G1 fázisok akcelerációjára utal. A vizsgált fehérjék expressziója nem mutatott szignifikáns különbséget vastag és áttéti melanomák között.



9. ábra. A vizsgált sejtciklus-szabályozó fehérjék expressziójának vázlatos ábrázolása a ciklus során. E sejtmagi proteinek immunhisztokémiai kimutatásával elkülöníthetővé váltak a főbb sejtciklusfrakciókban, a G1 és poszt-G1 fázisokban (S-G2 és G2-M) lévő sejtek.

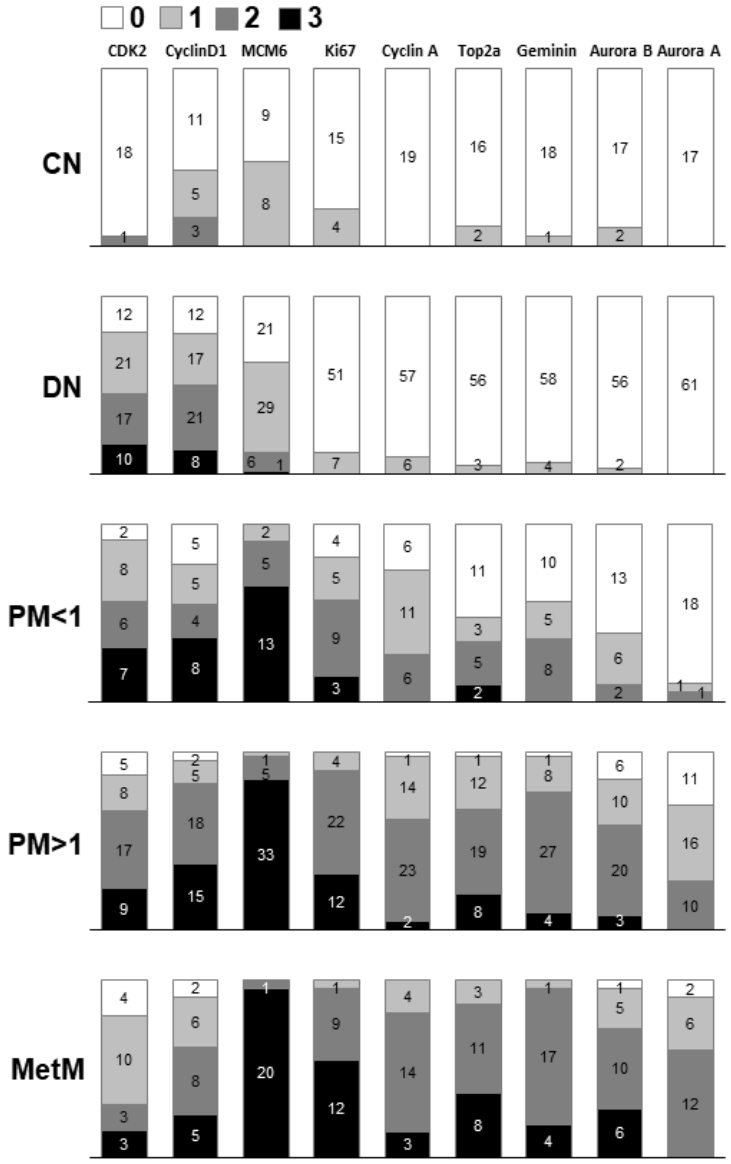


MCM6	<	MCM6	≈	MCM6
Cyclin D1	≈	Cyclin D1	≈	Cyclin D1
CDK2	≈	CDK2	≈	CDK2
(Ki67)	<	Ki67	<	Ki67
		Cyclin A, Geminin, Top2a	<	Cyclin A, Geminin, Top2a
		(Aurora B)	<	Aurora A & B

10. ábra. Sejtciklus-szabályozó fehérjék dysplasticus naevusokban (**A, B**), vékony (≤ 1 mm) (**C-F**), vastag (**G, I, J**) és áttéti melanomákban (**H**). **A, C, G:** MCM6 (**C** demonstrálja a digitális sejtszámolást). **B:** CDK2 (pozitív dysplasticus és negatív compoud naevus terület - CN). **D, H:** Ki67. **E, I**: cyclin A. **F:** geminin. **J:** aurora kináz B (kiemelés: késői metafázisban lévő osztódó sejt).

8. táblázat. Sejtciklus-fázismarkerek különböző expressziója jó- és rosszindulatú melanocytás daganatokban. *: A p-értékeket minden határértéknél kétoldalas Fisher-féle egzakt teszttel határoztam meg. A szignifikáns eseteket (p<0,05) félkövér betűtípussal emeltem ki.

	Közönséges naevus		vs. (p)	**Dysplasticus naevus**		vs. (p)	**Vékony invazív melanoma (≤1 mm)**		vs. (p)	**Vastag melanoma (>1 mm)**		vs. (p)	**Áttéti melanoma**	
CDK2														
≥1%	1/19	5,3%	**0,000**	48/60	80%	0,330	21/23	91,3%	1,000	34/39	87,2%	0,471	16/20	80%
≥10%	1/19	5,3%	**0,002**	27/60	45%	0,462	13/23	56,5%	0,587	26/39	66,7%	**0,012**	6/20	30%
≥30%	0/19	0%	0,107	10/60	16,7%	0,224	7/23	30,4%	0,559	9/39	23,1%	0,734	3/20	15%
Cyclin D1														
≥1%	8/19	42,1%	**0,004**	46/58	79,3%	1,000	17/22	77,3%	0,086	38/40	95%	0,602	19/21	90,5%
≥10%	3/19	15,8%	**0,014**	29/58	50%	0,805	12/22	54,5%	**0,035**	33/40	82,5%	0,117	13/21	61,9%
≥30%	0/19	0%	0,189	8/58	13,8%	**0,032**	8/22	36,4%	1,000	15/40	37,5%	0,391	5/21	23,8%
MCM6														
≥1%	8/17	47,1%	0,270	36/57	63,2%	**0,001**	20/20	100%	-	39/39	100%	-	21/21	100%
≥10%	0/17	0%	0,192	7/57	12,2%	**0,000**	18/20	90%	0,263	38/39	97,4%	1,000	21/21	100%
≥30%	"	"	1,000	1/57	1,8%	**0,000**	13/20	65%	0,106	33/39	84,6%	0,404	20/21	95,2%
Ki67														
≥1%	4/19	21,1%	0,449	7/58	12,1%	**0,000**	17/21	81,0%	**0,013**	38/38	100%	-	22/22	100%
≥10%	0/19	0%	-	0/58	0%	**0,000**	12/21	57,1%	**0,007**	34/38	89,5%	0,643	21/22	95,5%
≥30%	"	"	-	"	"	**0,017**	3/21	14,3%	0,214	12/38	31,6%	0,104	12/22	54,5%
Cyclin A														
≥1%	0/19	0%	0,328	6/63	9,5%	**0,000**	17/23	73,9%	**0,008**	39/40	97,5%	1,000	21/21	100%
≥5%	"	"	-	0/63	0%	**0,000**	6/23	26,1%	**0,008**	25/40	62,5%	0,160	17/21	81,0%
≥20%	"	"	-	"	"	-	0/23	0%	0,529	2/40	5%	0,329	3/21	14,3%
Top2a														
≥1%	2/18	11,1%	0,332	3/59	5,1%	**0,000**	10/21	47,6%	**0,000**	39/40	97,5%	1,000	22/22	100%
≥5%	0/18	0%	-	0/59	0%	**0,000**	7/21	33,3%	**0,015**	27/40	67,5%	0,136	19/22	86,4%
≥20%	"	"	-	"	"	**0,066**	2/21	9,5%	0,470	8/40	20%	0,226	8/22	36,4%
Geminin														
≥1%	1/19	5,3%	1,000	4/62	6,5%	**0,000**	13/23	56,5%	**0,000**	39/40	97,5%	1,000	22/22	100%
≥5%	0/19	0%	-	0/62	0%	**0,000**	8/23	34,8%	**0,001**	31/40	77,5%	0,082	21/22	95,5%
≥20%	"	"	-	"	"	-	0/23	0%	0,287	4/40	10%	0,438	4/22	18,2%
Aurora B														
≥1%	2/19	10,5%	0,253	2/58	3,4%	**0,000**	8/21	38,1%	**0,000**	33/39	84,6%	0,405	21/22	95,5%
≥5%	0/19	0%	-	0/58	0%	0,068	2/21	9,5%	**0,000**	23/39	59,0%	0,406	16/22	72,7%
≥20%	"	"	-	"	"	-	0/21	0%	0,545	3/39	7,7%	0,060	6/22	27,3%
Aurora A														
≥1%	0/17	0%	-	0/61	0%	0,059	2/20	10%	**0,000**	26/37	70,3%	0,111	18/20	90%
5-20%	"	"	-	"	"	0,247	1/20	5%	0,076	10/37	27,0%	**0,023**	12/20	60%

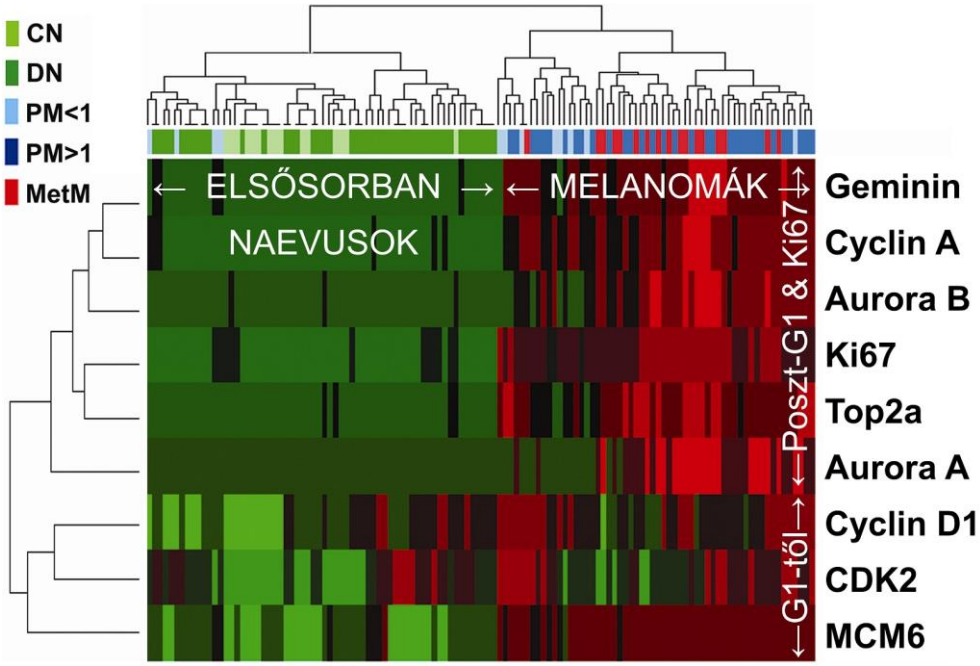


11. ábra. Sejtciklusfehérjék expressziója az általunk vizsgált melanocytás entitásokban (PM<1: ≤ 1 mm vékony, PM>1: > 1 mm vastag melanoma). Az oszlopdiagramokon az árnyalatok az expresszió mértékét tükrözik (lásd **8. táblázatot** is), a számok a megfelelő esetek számát jelzik.

5.2 *Melanocytás daganatok klaszteranalízise sejtciklus-fázismarkerek expressziója alapján*

A részletes *in situ* fehérje-expressziós profil alapján a dysplasticus naevusoktól a vastag melanomákig terjedő tumorprogresszió párhuzamba állítható a sejtciklusmarkerek fokozatos akcelerációjával, amit a klaszteranalízissel nyert hőtérkép is mutat (**12. ábra**). A benignus és malignus esetek jól elkülönültek egymástól, habár ezeken a fő kategóriákon belül már keveredtek a különböző alcsoportok. Négy melanomaeset a benignus daganatok közé sorolódott, ennek következtében ez a téves osztályozás kedvezőtlen klinikai következménnyel járhat. Mindazonáltal, ez a négy páciens 7–10 év után is daganatmentesnek bizonyult.

A dendrogramok a sejtciklusmarkereket funkciójukkal összhangban csoportosították, kapcsolatot mutatva az S-G2 fázismarkerek (geminin, cyclin A, Top2a, valamint a Ki67 is ide sorolódott) és az M fázisszabályozók (aurora A és B) között. A hierarchia legmagasabb fokán az MCM6 állt.



12. ábra. Sejtciklus-fázismarkerek komplex tesztelésén alapuló súlyozatlan hierarchikus klaszteranalízis hőtérképe. A felső dendrogramok külön csoportosítják a naevusokat és a melanomákat, de az alcsoportok ezen belül keverednek. A vastag (PM>1) és áttéti melanomák (MetM) együtt csoportosulnak. A bal oldali dendrogramok szoros korrelációt mutatnak a poszt-G1 fázismarkerek és a Ki67, valamint a korai sejtciklus-markerek és az MCM6 között.

A Spearman-rangkorrelációs együttható (ρ) primer melanomákban ugyanerre utalt, 0,51–0,77 volt a poszt-G1 (S-G2-M) fázismarkerek között, 0,44–0,65 a Ki67 és poszt-G1 fázismarkerek között és 0,44–0,59 az MCM6 és poszt-G1-fehérjék vagy Ki67 között (az eddig felsoroltak szignifikáns pozitív korrelációk voltak, $p<0{,}001$). Szignifikáns pozitív összefüggés látszott a cyclin D1 és CDK2 között is ($\rho=0{,}47$), ám ezek és a poszt-G1 fázismarkerek között nem volt ilyen összefüggés.

5.3 A sejtciklusmarkerek elkülönítik a dysplasticus naevusokat a vékony melanomáktól

Diszkriminanciaanalízist végeztünk a markerkombinációk prediktív értékének meghatározásához, a dysplasticus naevusok és vékony melanomák elkülönítésére. Az MCM6 (≥10% határértéknél) + Ki67 (≥1%) vagy cyclin A (≥1%) bizonyult a legjobb markerkombinációnak, mely helyesen osztályozta az eredeti minták 95,9%-át és a keresztvalidált esetek 93,2%-át, 89,5%-os szenzitivitással és 92,6%-os specificitással (**9. és 10. táblázat**).

9. táblázat. Dysplasticus naevusok és vékony (≤ 1 mm) invazív melanomák osztályozása diszkriminancia-analízissel, az MCM6, Ki67 és cyclin A kombinált detektálásával. PM<1: vékony invazív melanoma ≤ 1 mm.

Markerkombináció MCM6 + Ki67 vagy cyclin A			**Előrejelzett csoportosítás** DN	PM<1	Összesen
Eredeti	Esetszám	DN	53	1	54
		PM<1	2	17	25
	%	DN	98,1	1,9	
		PM<1	10,5	89,5	
Keresztvalidált	Esetszám	DN	53	1	54
		PM<1	4	15	19
	%	DN	98,1	1,9	
		PM<1	21,1	78,9	

Az eredeti esetek 95,9%-a helyesen osztályozva
A keresztvalidált esetek 93,2%-a helyesen osztályozva

10. táblázat. Sejtciklus-markerek szenzitivitása és specificitása vékony invazív és dysplasticus naevusok elkülönítésére. A határérték frekvenciák arra utalnak, mennyi a jelölődött sejtek minimális aránya a pozitív osztályozás kritériumaként.

Marker (illetve kombináció)	Határérték frekvencia	Szenzitivitás	Specificitás	Esetszám (dysplasticus naevus / vékony melanoma)
MCM6 +Ki67 vagy cyclin A	≥10% ≥1% ≥1%	89,5%	92,6%	54 / 19
MCM6	≥10%	90%	87,7%	57 / 20
Ki67	≥1%	81,0%	87,9%	58 / 21
Cyclin A	≥1%	73,9%	90,5%	63 / 23
MCM6	≥30%	65%	98,2%	57 / 20
Ki67	≥10%	57,1%	100%	58 / 21
Geminin	≥1%	56,5%	93,5%	62 / 23
Top2a	≥1%	47,6%	94,9%	59 / 21

5.4 In silico *connexin génexpresszió analízis*

A connexin-génexpressziós eredmények összehasonlításának szignifikáns eredményeit, beleértve az *in silico* kutatásokat a **11. táblázatban** mutatom be. A GSE3189 array adathalmazában a melanomák csökkent GJA1 (Cx43; *LogFC*=-4,1; *p*<0,001), GJB3 (Cx31; „log-fold-change", *LogFC*=-3,4; *p*<0,001), GJB5 (Cx31.1; *LogFC*=-3,3; *p*<0,001) és fokozott GJB1 (Cx32; *LogFC*=+1,5; *p*<0,001) génexpressziót mutattak, naevusokkal összehasonlítva (276).

A GSE7553 array-ben az áttéti melanomák csökkent GJA1 (Cx43; *LogFC*=-1,9; *p*<0,001), GJB2 (Cx26; *LogFC*=-4,6; *p*<0,001), GJB3 (Cx31; *LogFC*=-3,2; *p*<0,001),

GJB5 (Cx31.1; *LogFC*=-2,5; *p*<0,001) és GJB6 (Cx30; *LogFC*=-7,1; *p*<0,001) génexpressziót mutattak, primer melanomákhoz képest (beleértve az *in situ* elváltozásokat) (277). A GJA3/Cx46 alacsony szinten ugyancsak kimutatható volt, de nem mutatott különbséget a két csoport között.

A GSE8401 array-ben xenograft modellekből származó melanoma metasztázisokban csökkent GJA1 (Cx43; *LogFC*=-2,8; *p*<0,001), GJB3 (Cx31; *LogFC*=-1,8; *p*<0,001) és GJB5 (Cx31.1; *LogFC*=-1,1; *p*<0,001) génexpresszió mutatkozott, primer melanomákkal összehasonlítva (278).

11. táblázat. Az *in silico* analízis, valamint az mRNS- és fehérje-expressziós eredményeink összefoglalása sejttenyészetekben és szövetmintákban. > vagy <: szignifikáns különbség, ~: nincs szignifikáns különbség, neg.: negatív, N: nevus, M: melanoma, CP: citoplazmatikus immunreakció, PN: paranukleáris, CM: sejtmembrán. *: pozitív mindhárom GJB1 TaqMan próbával, **: negatív psHs.PT.56a.4848609 próbával, de pozitív Hs00939759s1 és Hs04259568s1 próbákkal.

Connexin izotípus		**mRNS-expresszió *in silico* analízise**			**qRT-PCR (*ΔcT*)/immunhisztokémia**				**Immunhisztokémia (% poz.) Naevus vs. melanoma**
Gén	**Fehérje**	**GSE3189 (klinikai)**	**GSE7553 (klinikai)**	**GSE8401 (xenograft)**	**Melanocyta**	**WM983/A (vertikális)**	**HT199 (áttéti)**	**A2058 (áttéti)**	
GJA1	Cx43	N > M	PM > MMet	PM > MMet	3,34/ CP, PN, CM	neg./ neg.	neg./ neg.	neg./ neg.	CM: 75 > 5
GJA3	Cx46	alacsony			11,75/ CP	8,56/ CP	6,99/ PN	9,85/ CP	PN: 100 ~ 96
GJB1	Cx32	N < M	PM ~ MMet	PM ~ MMet	neg./ neg.	*5,65/ CP	**5,25/ neg.	**4,92/ neg.	CP: 88 ~ 97 CM: 17 ~ 11 PN: 0 < 15
GJB2	Cx26		PM > MMet		4,53/ CP	3,78/ neg.	8,51/ CP, CM	12,45/ CP	erős: 65 < 85 CP: 37 < 66 PN: 63 > 34
GJB3	Cx31	N > M	PM > MMet	PM > MMet	neg.	3,23	11,64	neg.	
GJC1	Cx45	N ~ M	PM ~ MMet	alacsony	8,16	neg.	7,65	8,31	
GJC3	Cx30.2				12,38/ PN	12,93/ neg.	11,29/ PN	12,41/ neg.	PN: 3 < 23

5.5 Connexin génexpresszió tenyésztett primer melanocytákban és melanoma sejtvonalakban

A GJ/Cx izotípusok expressziójának küszöbciklusát („cycle threshold”, cT) a háztartási gén ACTB-vel hasonlítottuk össze (*ΔcT*) (**13. ábra**). Az ACTB szignál kezdete (átlagos cT) a 17–23. ciklus közé esett, a Cx gének szignálját pedig akkor tekintettük pozitívnak, ha küszöbciklusuk 35. ciklus alatti volt.

A GJA1 (Cx43) gén csupán a melanocyta tenyészetben expresszálódott (*ΔcT*=3,34, standard deviáció, *SD*=0,03).

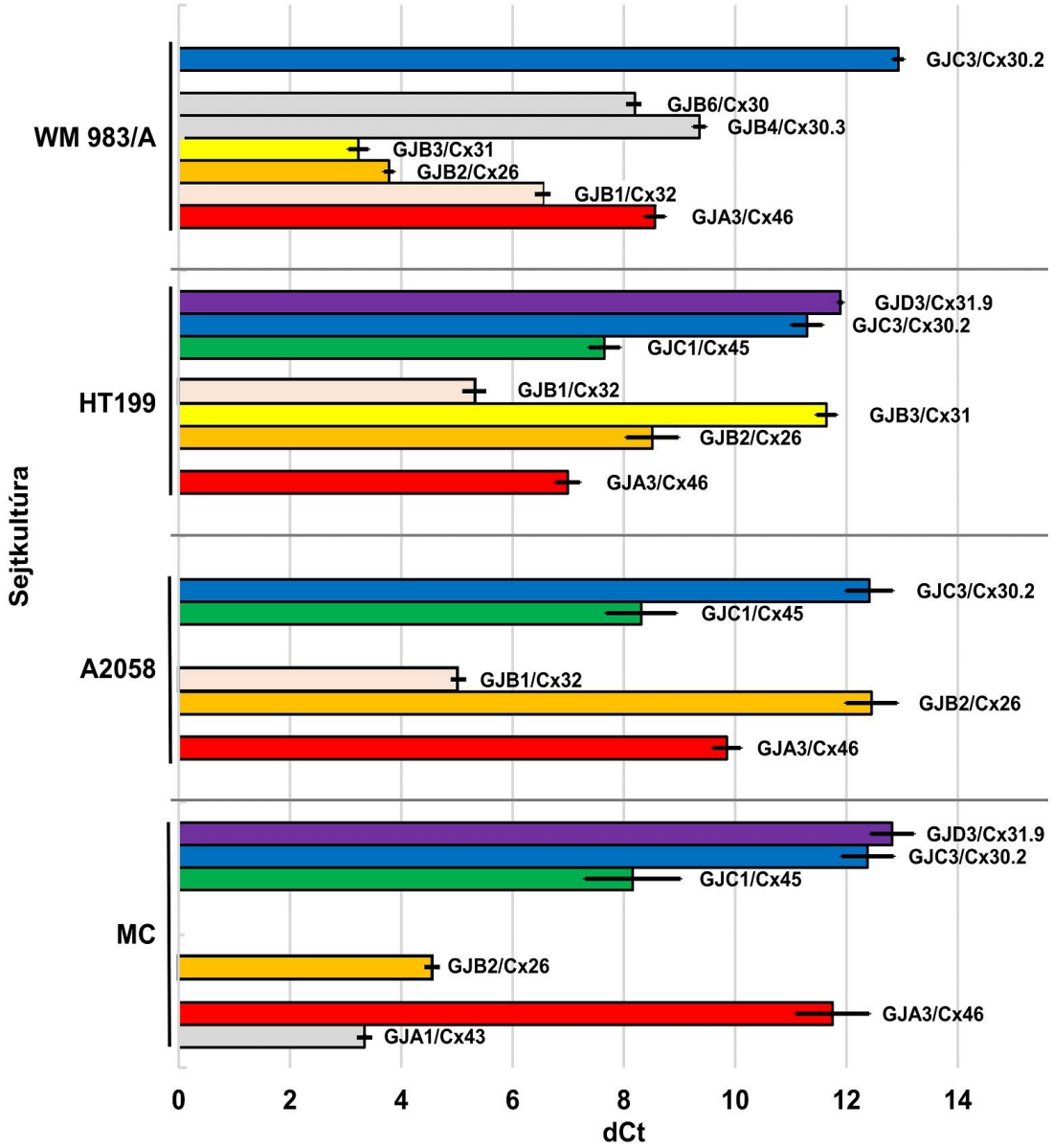
A GJA3 (Cx46) mRNS szintek alacsonyabbak voltak melanocytákban (*ΔcT*=11,75; *SD*=0,66) mint az A2058 (*ΔcT*=9,85; *SD*=0,25), WM983/A (*ΔcT*=8,56; *SD*=0,18) és HT199 (*ΔcT*=6,99; *SD*=0,22) melanoma sejtvonalakban. Melanocytával összehasonlítva, a relatív expressziós hányados („relative quotient”, *RQ*) 16,544 volt HT199-ben, 8,595 WM983/A-ban és 3,741 A2058-ban. Szignifikánsan magasabb mRNS szinteket detektáltunk HT199-ben ($p<0,001$), WM983/A-ban ($p<0,001$) és A2058-ban ($p=0,026$), mint melanocytákban; HT199-ben ($p<0,001$) és WM983/A-ban ($p<0,001$) az A2058 sejtvonallal összevetve, valamint HT199-ben a WM983/A-val összehasonlítva ($p=0,028$).

A GJB1 (Cx32) melanocytában nem volt azonosítható, de markánsan expresszálódott mindhárom melanoma sejtvonalban: a WM983/A-ban (*ΔcT*=6,65; *SD*=0,23), a HT199-ben (*ΔcT*=5,25; *SD*=0,42) és az A2058-ban (*ΔcT*=4,92; *SD*=0,14). (Megjegyzendő, hogy a Hs.PT.56a.4848609 TaqMan próbával nem detektáltunk GJB1 mRNS-t HT199 és A2058 sejtekben.)

A GJB2 (Cx26) melanocytában (*ΔcT*=4,53; *SD*=0,13) és WM983/A-ban (*ΔcT*=3,78; *SD*=0,09) expresszálódott, míg szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott HT199-ben (*ΔcT*=8,51; *SD*=0,47; $p<0,001$) és nagyon alacsony szinteket A2058-ban (*ΔcT*=12,45; *SD*=0,46; $p<0,001$). Melanocytával összehasonlítva, az *RQ* érték 1,683 volt WM983/A-ban, 0,004 A2058-ban és 0,063 HT199-ben. A különbségek MC és WM983/A ($p<0,001$), melanocyta és A2058 ($p<0,001$), valamint melanocyta és HT199 ($p<0,001$) között voltak szignifikánsak.

A GJB3 (Cx31) magas expressziót mutatott WM983/A-ban (*ΔcT*=3,23; *SD*=0,18), alacsonyabb szintet HT199-ban (*ΔcT*=11,64; *SD*=0,18), de nem tudtuk kimutatni melanocytában és A2058-ban.

A GJC1 (Cx45) szignifikánsan magasabb expressziót mutatott HT199-ben (*ΔcT*=7,65; *SD*=0,28) mint melanocytában (*ΔcT*=8,16; *SD*=0,86) ($p<0,001$) és A2058-ban



13. ábra. Connexin génexpresszió tenyésztett primer melanocytákban (MC) és melanoma sejtvonalakban (A2058, WM983/A, HT199). Az expresszió határérték-ciklusát az ACTB háztartási géhéz viszonyítottuk (dCt). Azokat a géneket, melyek több tenyészetben is megjelentek, színezve ábrázoltam. A fekete vonalak a szórást ábrázolják legalább 3 izolátum mérése alapján. A legmagasabb expressziót mutató géneket a legrövidebb sávok reprezentálják: GJA1 (Cx43) a MC-ban, GJB2 (Cx26) és GJB3 (Cx31) WM 983/A-ban, valamint GJB1 (Cx32) mindhárom melanomában.

(*ΔcT*=8,31; *SD*=0,63) míg nem volt detektálható WM983/A-ban. Melanocytával összehasonlítva, az *RQ* érték 1,424 volt HT199-ben és 0,899 A2058-ban.

A GJC3 (Cx30.2) alacsony szinten valamennyi mintában expresszálódott: a HT199-ben (*ΔcT*=11,29; *SD*=0,28), melanocytában (*ΔcT*=12,38; *SD*=0,47), az A2058-ban (*ΔcT*=12,41; *SD*=0,42) és a WM983/A-ban (*ΔcT*=12,93; *SD*=0,10). Melanocytával összevetve, az *RQ* érték 2,131 volt HT199-ben, 0,986 A2058-ban és 0,687 WM983/A-ban. HT199-ben a GJC3 expresszió szignifikánsan magasabb volt mint A2058-ban (*p*=0,033) vagy WM983/A-ban (*p*=0,031), és magasabb volt melanocytában (*p*=0,024) vagy A2058-ban (*p*=0,004) mint WM983/A-ban.

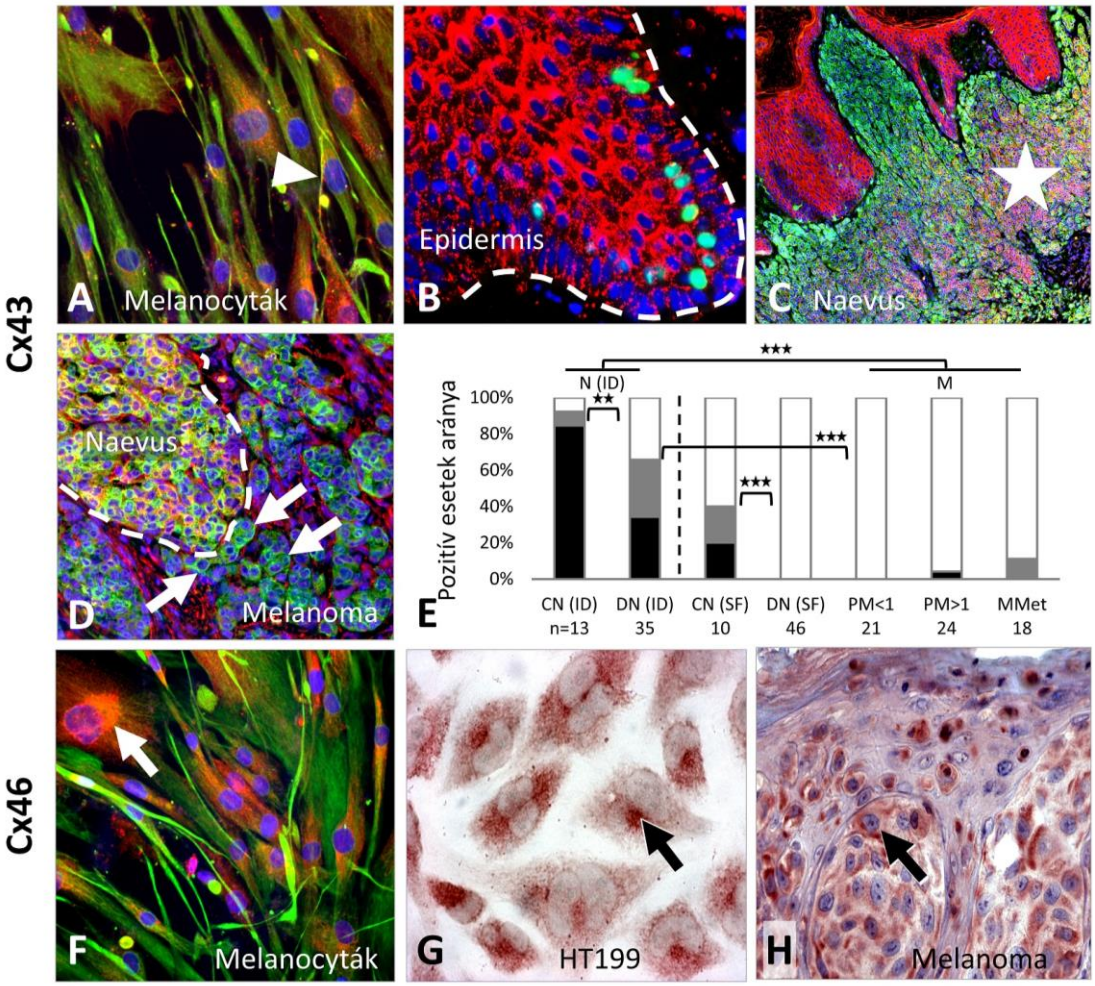
A GJD3 (Cx31.9) mRNS kimutatható volt HT199-ben (*ΔcT*=11,89; *SD*=0,05; *RQ*=1,912) és kisebb mértékben melanocytában (*ΔcT*=12,82; *SD*=0,39).

GJB4 (Cx30.3) (*ΔcT*=9,36; *SD*=0,11) és GJB6 (Cx30) (*ΔcT*=8,20; *SD*=0,03) génexpressziót csupán a WM983/A sejtvonalban tudtuk kimutatni, és a GJA4 (Cx37), GJB5 (Cx31.1), GJB7 (Cx25), GJC2 (Cx47), GJD2 (Cx36) valamint GJD4 (Cx40.1) mRNS-ek expressziója egyik mintában sem igazolódott.

5.6 Connexin fehérje-izotípusok in situ *detektálása melanocytákban és melanocytás daganatokban*

A Cx43 (GJA1) partikuláris (vagy pontszerű) citoplazmatikus és fokális membranózus mintázatú immunfestődésként mutatkozott melanocyta tenyészetben, de nem mutatott reakciót A2058, HT199 és WM983/A melanoma sejtvonalakban (**14/A. ábra**). Szövetmetszetekben, a Cx43 mint granuláris sejtplazma- és sejtmembrán-reakció volt megfigyelhető az epidermális keratinocytákban (**14/B. ábra**), valamint közöttük és a melanocyták között. Minden közönséges (13/13, 100%) és a dysplasticus naevusok nagy része (23/35, 66%) pozitív volt, szignifikáns különbség nélkül (**14/C-E. ábra**). Ha a gyenge reakciót (sejtek ≤25%-a) negatívnak tekintettük, a pozitivitási ráta szignifikánsan magasabb volt 11/13 (85%) közönséges naevusban, mint 12/35 (34%) dysplasticusban (*p*=0,003). Alig figyeltünk meg Cx43 reakciót közönséges (1/10, 10%) és dysplasticus naevusok (0/46, 0%) felszínes régióiban, valamint primer (1/45, 2%) és áttéti melanomákban (2/18, 11%).

A Cx46 (GJA3) immunreakció diffúz citoplazmatikus, néha sejtmembrán-lokalizációt mutatott primer melanocytákban és WM983/A valamint A2058 sejtvonalakban, míg elsősorban paranukleáris festődést HT199 melanoma sejtvonalban (**14/F-G. ábra**).



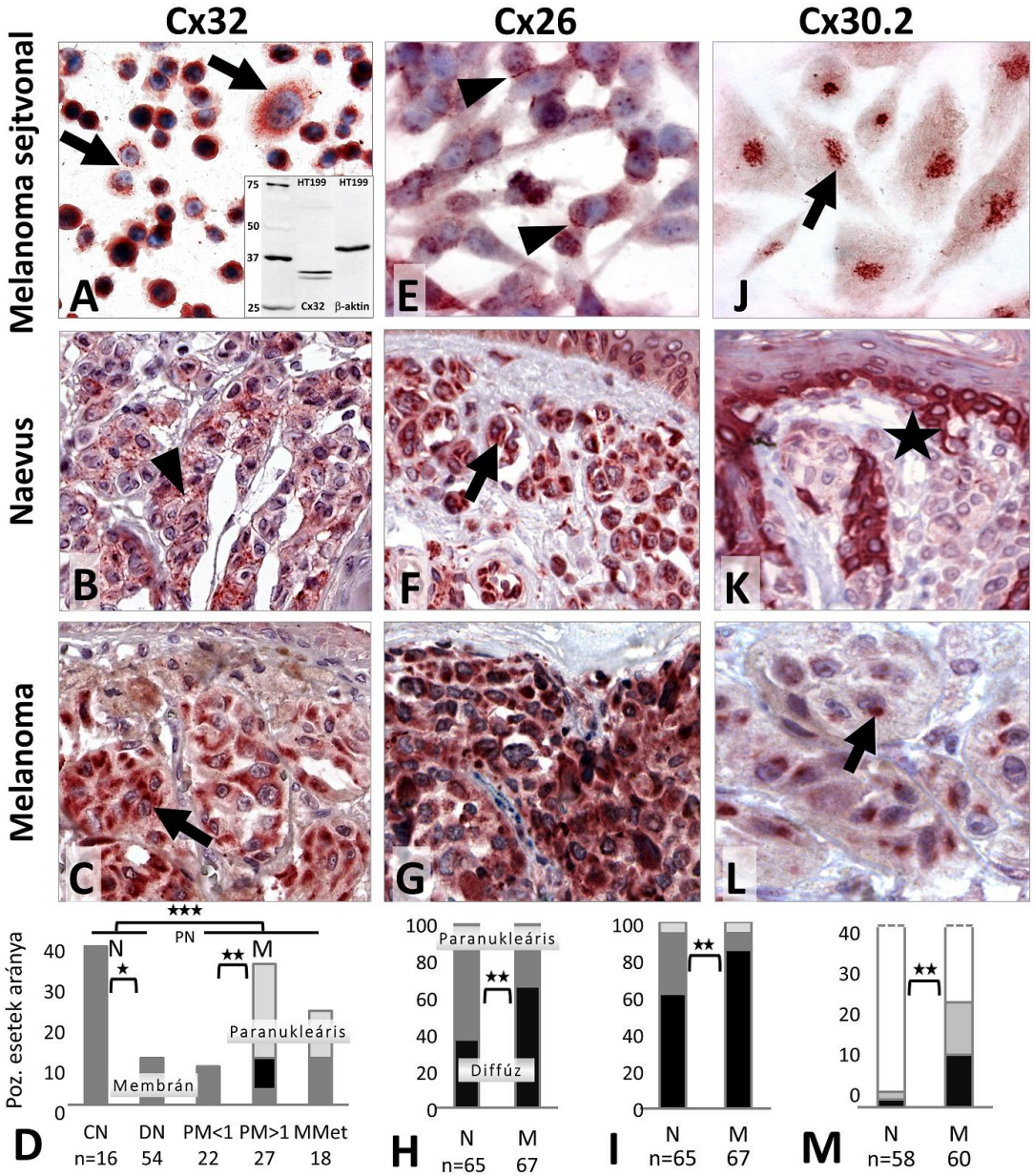
14. ábra. Cx43 (**A-E**) és Cx46 (**F-H**) fehérje-expresszió melanocytákban és elváltozásaikban (immunfluoreszcens képeken a Cx43 piros, a magfestés kék). A tenyésztett primer melanocyták granuláris sejtplazmai és membranózus (nyílhegy) festődést mutattak (**A**; a vimentin intermedier filamentumok zölddel jelölve). Denz granuláris jel látható a melanoma körüli epidermális hyperplasiában a keratinocyták között valamint kisebb mértékben a bazális réteg minden sejtje körül (a szaggatott vonal mentén), beleértve a melanocytákat is (**B**; a Ki67-pozitív proliferáló keratinocyták zölddel jelölve). Erős reakció látszik egy közönséges naevus érett középső és bazális regióiban (csillag) (**C**; zöld színnel a melan A-festődés látszik). Cx43-pozitív naevusfészek (szaggatott vonalon belül) és stromalis sejtek, Cx43-negatív atípusos sejtekkel (nyilak) egy naevus-alapú melanomában (**D**; zöld: melan A). A Cx43-expressziót bemutató diagram CN-ban és DN-ban, vékony (PM<1) és vastag (PM>1) PM-ban valamint MMet-ban (**E**; ★★★: p<0,001; ★★: p<0,01; N: naevus, M: melanoma; ID: intradermális, SF: felszínes területek; ■ fekete: sejtek >25%-ában, ■ szürke: 5–25%, □ fehér: <5%). Cx46 immunreakció paranukleáris (ER/Golgi; nyilak) akkumulációt mutat tenyésztett melanocytákban (**F**, zöld: vimentin), HT199 áttéti melanoma sejtvonalban (**G**) és nodularis melanomában (**H**). (Az immunperoxidáz reakciók során piros 3-amino-9-etilkarbazol kromogént használtunk.)

Szövetmintákban a Cx46 reakció paranukleáris helyzetű volt minden naevusban (56/56, 100%) és a legtöbb melanomában (55/57, 96%), ritkán pedig a sejtmembránhoz kötötten mutatkozott. Naevusok és melanomák, valamint alcsoportjaik között nem volt szignifikáns különbség a pozitív sejtek arányára vonatkozóan (**14/H. ábra**).

A Cx32 (GJB1) fehérjét az A2058 és HT199 áttéti melanoma sejtvonalakban (**15/A. ábra**) mint granuláris és/vagy diffúz sejtplazmai reakciót detektáltuk, míg a WM983/A vertikális növekedési fázisból származó melanoma sejtekben és primer melanocytákban negatív volt. Szövetmetszetekben, közepes intenzitású Cx32 jelet láttunk 62/70 (89%) naevusban és 65/67 (97%) melanomában. Membranózus Cx32 lokalizációt figyeltünk meg 6/16 (38%) közönséges, míg csak 6/54 (11%) dysplasticus naevusban (p=0,023) (**15/B, D. ábra**) és 7/67 (10%) melanomában (köztük metasztázisokban is). Paranukleáris Cx32 festődést találtunk 8/27 (30%) vastag (**15/C-D. ábra**) és 2/18 (11%) áttéti melanomában, míg vékony (0/22, 0%) melanomákban (p=0,006) vagy naevusokban (0/70, 0%) (p=0,001) nem találtunk reakciót.

A Cx26 (GJB2) fehérje citoplazmatikus és olykor sejtmembrán-lokalizációt mutatott melanocytákban és A2058 valamint HT199 áttéti melanoma sejtekben (**15/E. ábra**). Szövetekben különböző szubcelluláris lokalizációkban figyeltük meg a Cx26-ot. Naevusokban a reakció javarészt paranukleáris volt (41/65, 63%, **15/F, H. ábra**), szemben a melanomák diffúz sejtplazmai reakciójával (44/67, 66%, p=0,002, **15/G-H. ábra**). Továbbá, a Cx26-ot expresszáló sejtek aránya szignifikánsan kevésbé volt magas naevusokban (40/65, 62% erősen festődő), mint melanomákban (57/67, 85%, p=0,003, **15/I. ábra**).

Sejtkultúrákban Cx30.2 (GJC3) immunreakciót figyeltünk meg primer melanocytákban és a HT199 melanoma sejtvonalban (**15/J. ábra**). Szövetekben a Cx30.2 nem vagy ritkán volt azonosítható közönséges (0/13, 0% **15/K, M. ábra**) vagy dysplasticus naevusban (2/45, 4%). Gyakoribb volt primer melanomákban (2/18, 11% vékony, 8/25, 32% vastag) és áttétes esetekben (4/17, 24%) (**15/L-M. ábra**), ahol citoplazmatikus és gyakran paranukleáris reakcióként jelentkezett. Naevus és melanoma között a különbség szignifikáns volt (p=0,002).



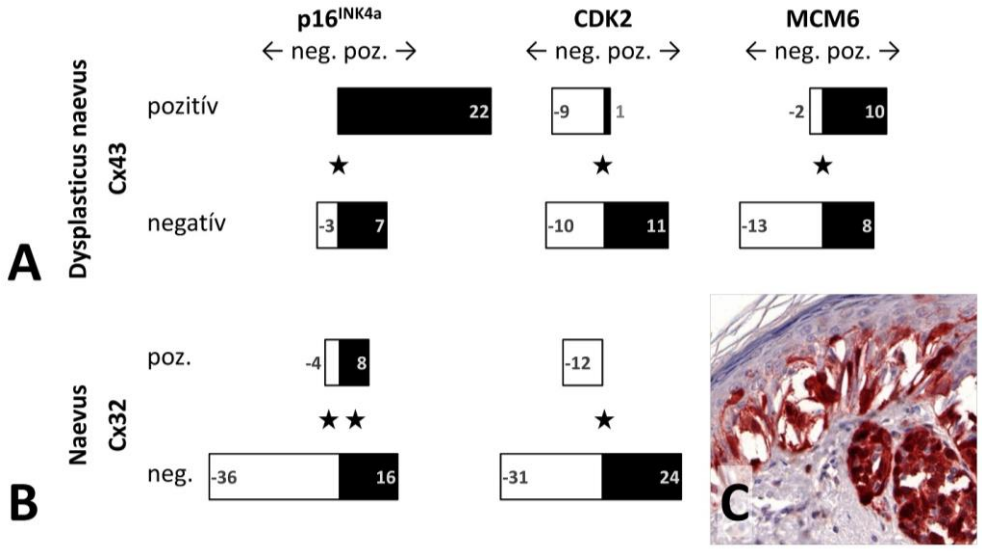
15. ábra. Cx32 (**A-C**), Cx26 (**E-G**) és Cx30.2 (**J-L**) immunperoxidáz-reakciók és a melanocytás daganatok Cx32 (**D**), Cx26 (**H-I**) és Cx30.2 (**M**) expresszióját ábrázoló grafikonok. Cx32 reakció a sejtplazmában mutatkozott WM983/A melanoma sejtvonalban (**A**; beillesztett kép: western blot), a sejtmembránban látszik (nyíl) egy DN-ban (**B**), illetve főként paranukleárisan akkumulálódik (nyíl) egy vastag melanomában (**C**). Cx26 reakció látható citoplazmatikusan és a sejtmembránban (nyílhegyek) a HT199 sejtvonalban (**E**), főként peri- és paranukleárisan (nyíl) festődik egy CN-ban (**F**) és diffúz sejtplazmai jelölést mutat egy MMet-ban (**G**), mely mintázatok szignifikánsan különböztek a csoportok között. Paranukleáris Cx30.2 festődés látszik a HT199 melanoma sejtvonalban (**J**) és egy vastag melanomában (**L**), míg nincs reakció egy CN-ban (csillag) (**K**), ahol a környező bazális keratinocyta-réteg pozitív (kivéve a melanocyták).

A diagramok jelzései: **D:** Cx32 ■ sötétszürke: membránreakció, ■ világosszürke: paranukleáris reakció, ■ fekete: mindkettő; ★★★: $p<0{,}001$, ★★: $p=0{,}002–0{,}010$, ★: $p=0{,}011–0{,}05$. **H:** Cx26 ■ fekete: diffúz, ■ szürke: paranukleáris; **I:** ■ fekete: >75%, ■ sötétszürke: 50-75%, ■ világosszürke: 10-50%. **M:** Cx30.2 ■ fekete: >25%, ■ szürke: 5-25%, □ fehér: <5%.

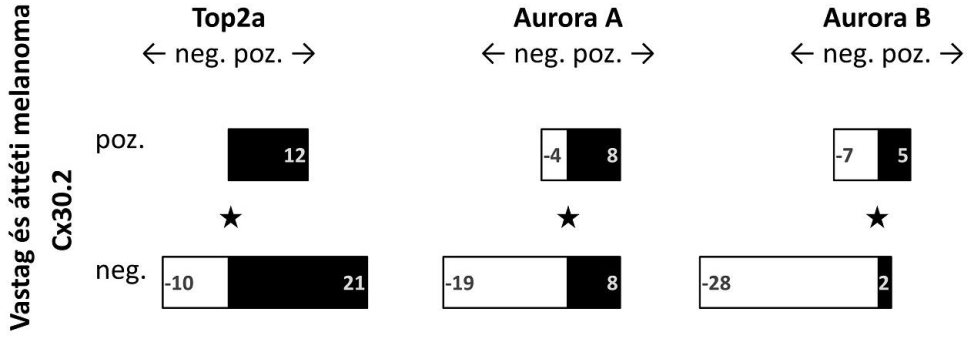
5.7 Sejtciklus-szabályozó és connexin fehérjék expressziójának összehasonlítása

Melanocytás daganatok szövetmintáiban összevetettük a connexinek és a sejtciklus-szabályozó fehérjék expresszióját, utóbbiakat a G1-fázist gátló $p16^{INK4a}$ vizsgálatával kiegészítve. A sejtek ≥ 1%-át érintő $p16^{INK4a}$ pozitivitás valamennyi (16/16) közönséges és 50/52 (96%) dysplasticus naevusban (**16/C. ábra**), 16/20 (80%) *in situ* és vékony, 17/27 (63%) vastag valamint 3/18 (17%) áttéti melanomában megfigyelhető volt. A különbség szignifikáns volt dysplasticus naevus és vékony melanoma (p=0,047), valamint vastag primer és áttéti melanoma között (p=0,002).

Dysplasticus naevusokban az intradermalis területeken Cx43-at expresszáló eseteknél (sejtek ≥5%-a 22/32 esetben pozitív) szignifikánsan gyakoribb volt a $p16^{INK4a}$-pozitivitás is (22/22 vs. 7/10; p=0,012), míg csökkent a CDK2 expresszió (Cx43 sejtek ≥25%-ában pozitív 10/31 esetben, CDK2 sejtek ≥10%-ában pozitív 12 esetben; 1/10 vs. 11/21, p=0,046), azonban az MCM6 jelenléte is fokozottabb volt (Cx43 sejtek ≥25%-ában pozitív 12/33 esetben, MCM6 sejtek ≥1%-ában pozitív 18 esetben; 10/12 vs. 8/21,



16. ábra. Dysplasticus naevusokban az intradermalis naevusrégiókat érintő 5% feletti Cx43-expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a fokozottabb $p16^{INK4a}$ expresszióval (1% határérték felett), 25% feletti Cx43-expresszió pedig a csökkent CDK2 (10% határérték) és fokozott MCM6 (1% határérték) expresszióval (**A**). Közönséges és dysplasticus naevusok összevont csoportjában a membranózus Cx32 expresszió ugyancsak szignifikáns összefüggést mutatott a fokozottabb $p16^{INK4a}$ (30% határérték), és csökkent CDK2 (10% határérték) expresszióval (**B**). Neg.: negatív (□ fehér), poz.: pozitív (■ fekete) a szövegben jelzett határérték alapján, ★★: p<0,010, ★: p=0,011–0,05. A diagramokban feltüntetett számok az esetek számát mutatják. **C:** Kifejett $p16^{INK4a}$ expressziót mutató dysplasticus naevus.



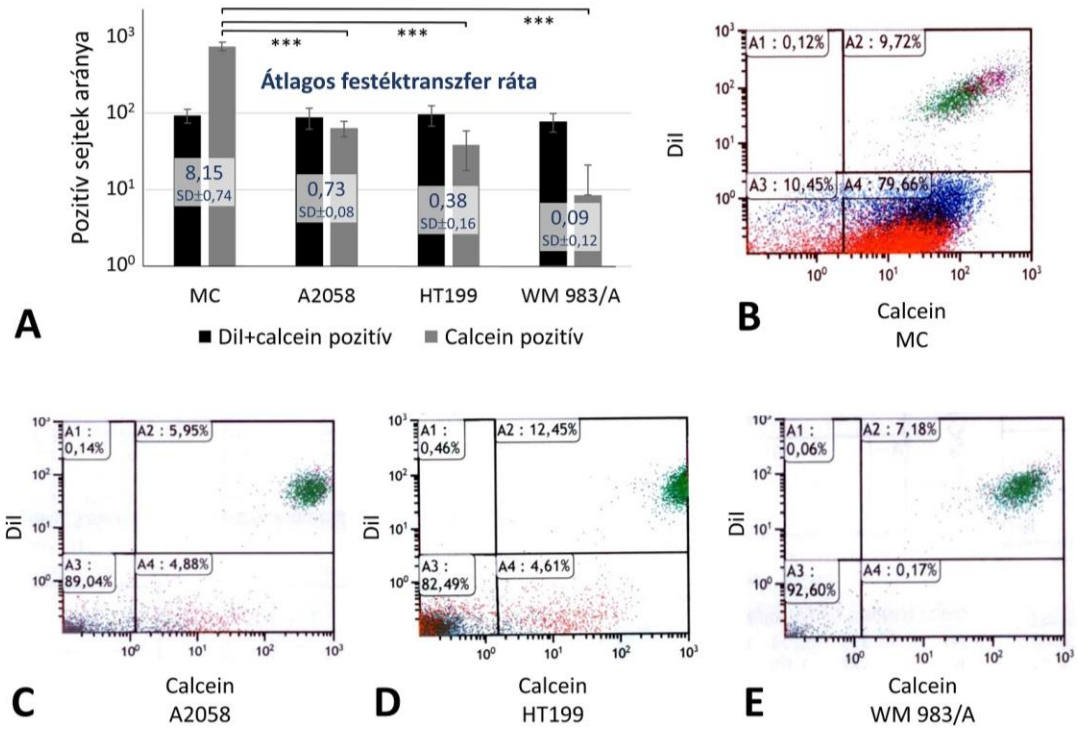
17. ábra. Vastag és áttéti melanomák összevont csoportjában a Cx30.2 expresszió (5% határérték) szignifikáns összefüggést mutatott a fokozottabb Top2a (5% határérték), aurora A (1% határérték) és aurora B (5% határérték) expresszióval. Neg.: negatív (□ fehér), poz.: pozitív (■ fekete) a szövegben jelzett határérték alapján, ★: $p<0,05$.

p=0,027) (**16/A. ábra**). Megfigyelésünk szerint a membranózus Cx32-t kifejező közönséges és dysplasticus naevusok egyúttal mind Cx43-pozitívak is voltak, és a CDK2-vel leírt szignifikáns negatív összefüggés a Cx32-vel is kimutatható volt (minden naevusra: 0/12 vs. 24/55, p=0,003, dysplasticus naevusra: 0/6 vs. 23/45, p=0,027) (**16/B. ábra**). Magas, a sejtek ≥30%-át érintő $p16^{INK4a}$ expresszió ugyancsak szignifikánsan gyakoribb volt membranózusan Cx32-pozitív mint -negatív naevusokban (8/12 vs. 16/52, p=0,043).

Mivel a vékony melanomákban nem találtunk jellegzetes connexin-mintázatot, itt nem volt lehetőség a sejtciklusfehérjékkel való összefüggés vizsgálatára. Vastag primer és áttéti melanomákat összevonva a Cx30.2 expresszióval szignifikánsan fokozódott a Top2a (≥5% határértéknél; 12/12 vs. 21/31, p=0,041), aurora A (≥1% határértéknél; 8/12 vs. 8/27, p=0,041) és aurora B (≥5% határértéknél; 5/12 vs. 2/30, p=0,014) kinázok expressziója is (**17. ábra**).

5.8 A „gap junction" kommunikáció festéktranszfer analízise

10^5 DiI + calcein-AM kettős pozitív sejtet és 9 x 10^5 azonos típusú, de jelöletlen sejttel ko-kultúrába tettünk, majd 5 óra inkubálás után áramlási citometriával elemeztük a sejtek közötti festéktranszfert (**18. ábra**). A szimplán (csupán calceinnel) jelölődött sejtek aránya a connexin-mebráncsatornákon lezajlott direkt festéktranszfer mértékékét jelezte. Míg a primer melanocyták 75,11%-a, addig az A2058 sejtek csupán 6,39%-a, a HT199 3,85%-a és a WM983/A sejtek 0,86%-a mutatott egyedüli calcein pozitivitást. A



18. ábra. A funkcionális festéktranszfer teszt áramlás-citometriás elemzése szignifikánsan magasabbnak mutatta a réskapcsolatok által közvetített calceintranszportot (a DiI + calcein kettős jelölt sejtekből az érintkező jelöletlen sejtek felé) tenyésztett primer melanocytákban, mint melanoma sejtvonalakban (**A**; logaritmusos ábrázolás; ***: p<0,001). A festéktranszfer-ráta (**A**) megmutatja, hogy átlagosan hány sejtbe jutott át calcein egyetlen kettősen jelölt sejtből. Reprezentatív példák az áramláscitometriás vizsgálatokról: MC melanocyta (**B**), A2058 (**C**), HT199 (**D**) és WM983/A (**E**) melanoma sejtvonalak.

festéktranszfer ráta, tehát az egy kettősen jelölt (DiI + calcein-AM) sejtre eső olyan sejtek száma, melybe calcein transzportálódott, primer melanocyta esetén 8,15 (*SD*=0,74), A2058 esetén 0,73 (*SD*=0,08), HT199 esetén 0,38 (*SD*=0,16), WM983/A esetén pedig 0,09 (*SD*=0,12) volt.

5.9 Connexin expresszió a tumor mikrokörnyezetben

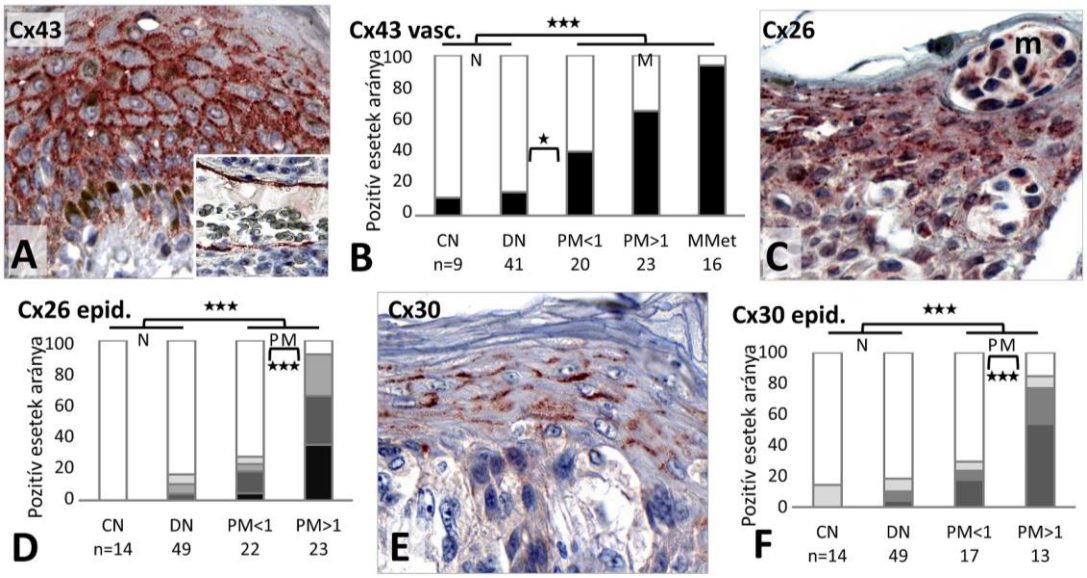
A primer melanomákkal határos epidermisben a Cx43 immunreakció intenzív volt, és valamennyi sejtréteget érintette (**19/A. ábra**), ellentétben az egészséges epidermisszel, ahol ez csak a bazális és szuprabazális rétegekre volt jellemző. Ez a felülreguláció szignifikánsan gyakoribb volt melanomákban (19/43, 44%), mint naevusokban (12/60, 20%, p=0,010), valamint vastag melanomákban (14/22, 64%) mint vékonyakban (5/21, 24%, p=0,014). A Cx43-at megfigyeltük az irha stromalis sejtjeiben is, naevus és melanoma mintákban egyaránt. A vaszkuláris és limfatikus endothelialis sejtek

gyakrabban voltak Cx43 pozitívak melanomákban (38/59, 64%), mint naevusokban (7/50, 14%, p<0,001), és ez emelkedő tendenciát mutatott a közönséges naevusoktól (1/9, 11%) a dysplasticus naevusokon (6/41, 15%), vékony (8/20, 40%) és vastag melanomákon át (15/23, 65%) az áttétekig (15/16, 94%), szignifikáns különbséggel a dysplasticus naevusok és vékony melanomák között (p=0,049) (**19/A-B. ábra**).

Gyengén vagy közepesen Cx46 pozitív sejteket figyeltünk meg a tumorfészkek körüli dermális stromában, beleértve a vaszkuláris sejteket is, de a megfigyelt csoportok között érdemi különbséget nem találtunk.

A dermális stroma elemei nem expresszáltak Cx32-t.

A daganat körüli felhám szignifikánsan magasabb Cx26 expressziót mutatott melanomákban (27/45, 60%), mint naevusokban (8/63, 13%, p<0,001), és a különbség szignifikáns volt a vékony (6/22, 27%) és vastag (21/23, 91%) melanomák között is (p<0,001) (**19/C-D. ábra**).



19. ábra. Connexin-expresszió a melanocytás daganatok mikrokörnyezetében. Egy vastag melanoma fölötti epidermisben a kerationocyták minden rétege intenzív Cx43-membránfestődést mutat (**A**). A beszúrt ábra egy áttéti melanoma körüli ér endotheliumának Cx43-pozitivitását mutatja. Daganattal összefüggő erek (vasc.) Cx43-expressziójának összesítése (**B**; ■ fekete: pozitív). Fokozott granuláris Cx26-reakció egy vastag melanoma fészke (m) körüli epidermisben (**C**). Összesítő a tumor körüli epidermális Cx26-expresszióról (**D**). Membránnal összefüggő Cx30 reakció a szuprabazális epidermális keratinocytákban egy vékony melanoma fölött (**E**). Diagram a daganat körüli epidermális (epid.) Cx30-expresszióról (**F**). (**D** és **F**: □ fehér: negatív, ■ világosszürke: csak a stratum granulosum pozitív, ■ közepesen szürke: a legfelsőbb rétegek pozitívak, ■ sötétszürke: a szuprabazális rétegek pozitívak, ■ fekete: minden epidermális keratinocyta-réteg pozitív). ★★★: p<0,001; ★: p=0,011–0,05.

A Cx30 ugyancsak szignifikánsan gyakrabban expresszálódott az epidermális keratinocytákban a primer melanomák fölött (20/34, 59%), mint naevusok esetében (11/63, 17%, $p<0,001$), és több vastag (15/17, 88%) mint vékony melanoma (5/17, 29%, $p=0,001$) volt érintett (**19/E-F. ábra**).

Az eltérő epidermális connexin-expresszió alapján a vastag és vékony melanoma 0,91-os szenzitivitással és 0,77-os specificitással volt elkülöníthető Cx26, míg 0,85-os szenzitivitással és 0,71-os specificitással Cx30 esetében.

Erős Cx30.2 jel látszott a daganat körüli epidermis (osztódó sejtekben gazdag) bazális rétegében, minden esetben (**15/K. ábra**), mely a felszínesebb rétegekre is kiterjedt 23/39 (59%) primer melanomában, szignifikánsan magasabban, mint a naevusokban (15/57, 26%, $p=0,002$).

6 Megbeszélés

6.1 A sejtciklus immunhisztokémiai vizsgálata melanocytás daganatokban, különös tekintettel a vékony melanomák és dysplasticus naevusok elkülöníthetőségére

A dysplasticus naevus a melanoma kockázati tényezője és bizonyos esetekben prekurzora, ám klinikai és szövettani hasonlóságuk, valamint az egyértelmű biomarkerek hiánya nemritkán megnehezíti az elkülönítését a transzformálódott, korai malignus elváltozásoktól (101, 102). Mivel a melanomák diagnosztikai tévesztése a valós patológiai gyakorlatban is előfordulhat, és ez a páciensek inadekvát ellátásához vezethet, nagy az igény a benignus és malignus melanocytás elváltozások specifikus és szenzitív elkülönítését segítő markerekre. Az elmúlt években fedezték fel, hogy a PRAME fehérje immunhisztokémiai kimutatása a fenti célra a napi gyakorlatban is hasznosítható lehet (104, 105), azonban ezzel a módszerrel is előfordulnak ellentmondásos leletek, így a további biomarkerek létjogosultsága sem szűnt meg. Jelen munkánkban *in situ* sejtciklus-analízist végeztünk, és kimutattuk, hogy a poszt-G1 fázisszabályozók vékony melanomákban megjelentek, míg dysplasticus naevusokban hiányoztak, ezzel jelezték a malignitást. Az elkülönítőképesség szenzitivitása tovább nőtt azzal, hogy az S fázis promoter cyclin A kimutatását a replikáció-engedélyező MCM6-éval és az általános proliferációs marker Ki67-ével kombináltuk. Vékonyabb melanomákkal összehasonlítva, az S-G2-M fázisszabályozók szignifikáns megemelkedése vastag (> 1 mm) melanomákban fokozott sejtciklus-progresszióra utalt, mely a vertikális növekedési fázisban tetőzött. A sejtciklus további érdemi változásának hiánya áttéti melanomákban azt jelezte, hogy a fokozott proliferáció nem egyedüli meghatározója a metasztatikus inváziónak.

A melanoma kialakulásához és progressziójához növekedésserkentő jelutakat (BRAF, NRAS) aktiváló, valamint funkcióvesztő mutációk (CDKN2A), a sejtciklus-ellenőrzőpontok ellenőrzésének epigenetikai deregulációja, sejtciklispromóterek génamplifikációja (CDK4, CCND1) és mikroszatellita-instabilitás vezethet (279-281). Ezek a különféle események mindannyian kóros sejtreplikációt eredményeznek (107), ami a malignus fenotípus indikátora. A melanomák fokozott replikációját benignus naevusokhoz viszonyítva kimutatták a CDK1, CDK2, CDK4 (118, 282), cyclin D1 (116,

283-286), cyclin E (118, 287, 288), cyclin A (116, 287, 289, 290), cyclin B1 (290, 291), MCM2 (292, 293), MCM3, MCM4 (294), geminin (293), Top2a (295, 296), aurora kináz A és B (297), valamint Ki67 (298-301) expressziójának vizsgálatával. Azonban a különböző sejtciklusfrakciók összehasonlító vizsgálatát melanocytás daganatokban még nem végezték el előttünk, sem összevetésüket a daganatprogresszióval. A korai összehasonlító vizsgálatokban leírt „nagyon gyenge immunreakciók" a pigmentált bőrdaganatok esetében a nem megfelelő antigénfeltárás, primer antitestek illetve immundetektáló rendszerek használatából is fakadhattak (118). A GSE12391 számú GEO globális mRNS-expressziós profilvizsgálat a melanomákban kimutatta ugyan a „proliferációs aláírást" a naevusokkal szemben, de nem a vékony/ radiális növekedésű melanomák és dysplasticus naevusok között (302). Ez talán azzal magyarázható, hogy a vizsgálatokat nem mikrodisszektált daganatmintákon, hanem egész szövettani lemezeken végezték el, és a környező proliferáló keratinocyták megzavarhatták az eredményt. Az *in situ* sejtciklusanalízis kiküszöbölheti ennek lehetőségét.

Az immunhisztokémia széleskörűen elérhető, költséghatékony és kevés szövetmintát igénylő technika, mely megbízhatóan, *in situ* képes kimutatni fehérjéket, köztük a sejtciklus-szabályozókat is. Ezek eltérő expressziója lehetővé teszi, hogy megbecsüljük a főbb sejtciklusfrakciókat (G1 és poszt-G1: S-G2 és G2-M fázisok) valós környezetben, összefüggésben a tumorprogresszióval (107, 303). A tiszta sejtmagi jelölődés, mely összhangban van a sejtciklusmarkerek biológiai szerepével, alkalmassá teszi a szövetmintát digitális patológiai vizsgálatokra (automatikus sejtszámlálás és a mikroszkopikus kiterjedések gyors, pontos mérése (304)).

Az MCM6-pozitivitás minden olyan daganatsejtet jellemez, mely engedélyt kapott a sejtciklus megkezdésére (305). G1 fázisban a sejtek még a növekedési jelútvonalak hatása alatt állnak, azonban az S fázistól függetlenednek tőle (107). Melanocytás daganatokban a replikációs szakasz, melyet a növekedési frakció és a sejtcikluskinetika határoz meg, a növekedésserkentő és sejtciklus-szabályozó útvonalak kórosan fokozott aktivitására utal, korrelálva a daganatprogresszióval és a klinikai tumornövekedéssel (109, 120). A növekedési frakciót legáltalánosabban a Ki67-indexszel mérik. Azonban mind a Ki67, mind az MCM6 fehérjék folyamatosan expresszálódnak a korai G1 fázistól az M fázis végéig, olyan sejteket is jellemezve, melyek megindultak ugyan a replikációs ciklusban, de nem haladnak végig rajta, így kimutatásuk pontatlan eredményre vezethet (107, 109).

Dysplasticus naevusokban pozitív reakciót figyeltünk meg MCM6, Ki67 és a G1 fázismarker cyclin D1 és CDK2 jelöléssel, melyek a replikációra elkötelezett sejtekre utaltak (120). Dysplasticus naevusokban a cyclin D1- és CDK2-expresszió szignifikáns emelkedését észleltük közönséges anyajegyekhez képest, azonban a melanomákkal összehasonlítva nem volt különbség. A cyclin D1 szerepe melanomákban tisztázatlan. A legtöbb vizsgálat a miénkkel összhangban arra utalt, hogy a cyclin D1 a melonocytás daganatfejlődés korai szakaszában már jelen van, és nem különbözik szignifikánsan dysplasticus naevusok és melanomák között (283), sőt, csökkenni látszott vertikális növekedési fázisú (116, 284) vagy áttéti melanomákban (285). Véletlenszerűen válogatott melanoma kohortokban, mint amilyen a legtöbb vizsgálat volt, köztük a miénk is, a gyakori CCND1 funkciónyerések (51%) és -vesztések (32%) valószínűleg kiegyenlítik egymást a fehérje-expressziós adatok elemzésekor (306). Az ilyen esetek változó aránya megmagyarázhatja a cyclin D1-re vonatkozó eredmények ellentmondásosságát a melanomafejlődés során.

Az S-G2 fázisokban kifejeződő sejtciklus-fázismarkerek, mint a cyclin A, Top2a és geminin, valamint a G2-M fázisokban expresszálódók, mint az aurora kináz A és B, olyan sejtcsoportokat jellemeznek, melyek már megkettőzték DNS-üket és nagy valószínűséggel véghezviszik a mitózist (107). A poszt-G1 fázismarkerek hiánya dysplasticus naevusokban azt sugallja, hogy a megindult replikáció nem tud lezajlani, megreked a G1 fázisban. A poszt-G1 fázismarkerek először vékony melanomákban jelentek meg, ez alapján alkalmasak lehetnek a malignus fenotípus jelzésére. A munkánkban tesztelt primer és áttéti melanomákban mind az MCM6, mind a Ki67-index magas korrelációt mutatott a poszt-G1 fázismarkerek expressziójával, arra utalva, hogy a dysplasticus naevusokkal ellentétben, a G1 fázisban rekedés („G1 phase arrest”) elhanyagolható a malignus melanomákban.

A súlyos mitotikus aberrációk esetén az M fázis lezajlása késlekedhet, de ezt leszámítva az időtartam, melyet a sejtek az S-G2-M fázisokban töltenek, közel állandó (109). Ez alapján a poszt-G1 fázisfrakciók a sejtciklus kinetikáját is jelzik melanomában. Munkánkban a poszt-G1 fázismarkerek progresszív expressziót mutattak a malignitás kialakulásától a vertikális daganatnövekedésig. Adataink azt sugallták, hogy melanocytás daganatokban egyre nagyobb számú sejt lép át az S fázisba, kettőzi meg a DNS-ét és esik át mitózison a dysplasticus naevus–vékony melanoma–vastag melanoma sor mentén. A

sejtcikus jobbra tolódása összecseng a replikáció fokozott progressziójával a primer melanoma fejlődése során.

A sejtciklus-fázismarkerek elkülönítő-képességét támogatja, hogy legalább két határérték mentén is szignifikáns eltérést mutattak a tumorprogressziós csoportok között, ami alkalmazhatóvá teheti őket a maligintás megállapítására, kérdéses melanocytás daganatok elkülönítő diagnosztikájában. Az MCM6 relatív magas frekvenciája (>10%) már akár csak alacsony fokú Ki67 pozitivitással (>1%) ill. cyclin A vagy más poszt-G1 fázismarker kimutathatóságával kombinálódva megnöveli a melanoma valószínűségét. A hosszú, 7-10 éves betegségmentes túlélés az általunk észlelt 4 esetben, melyekben nem találtunk malignitást jelző expresszióprofilt, támogatja a módszerünk használhatóságát. Az *in situ* sejtciklusvizsgálatok és a klinikai viselkedés retrospektív összehasonlítása tisztázhatja az alul- és túldiagnosztizálást, a bemutatott algoritmussal.

Összefoglalva, a kontrollálatlan sejtnövekedés és sejtciklus-szabályozás okozta kóros proliferáció a malignus fenotípus jellegzetessége. Melanocytás daganatokban a poszt-G1 fázisok és általános proliferációs markerek azonosítása kétes esetben is szignifikáns információt nyújthat a rosszindulatúságról, így segíthet megelőzni az akár végzetes kimenetelű fals negatív diagnózist, valamint nem utolsó sorban, támogatja a vertikális melanomanövekedéssel járó fokozott sejtciklus-progresszió koncepcióját.

A benignus és malignus daganatok nem csupán eltérő proliferációjukban, de környezetükkel való kapcsolatukban is különböznek egymástól. Korábbi vizsgálatunkban a hemidezmoszómális kollagén XVII (BP180, Col17a1) sejtreziduális régiója elsősorban malignus melanocytás tumorokban expresszálódott, míg benignusakban nem (274). Melanomákban csak az endondomén volt kimutatható, az esetek egy részében pedig ectodomén mutációt találtunk. Funkcionális assay vizsgálataink során a Col17a1 sejtreziduális régióját célzó antitesttel gátolni tudtuk melanoma sejtvonalak proliferációját és fokozni apoptózisát. Bőrhámsejtekben a fehérjének az őssejtfunkcióval való kapcsolatát is valószínűsítik, szabályozva azok kontrollált, aszimmetrikus proliferációját (307). A Col17a1 membránfehérje ugyanis nagy koncentrációban a bazális keratinocytákat (őssejtek) horgonyozza a bazális membránhoz, ectodoménje pedig a fiziológiás keratinocyta differenciálódás és felfelé vándorlás során sheddinggel távozik,

a fehérje expressziója megszűnik. A proliferáló hámsejtek zöme (a „transit amplifying” populáció) a suprabasalis rétegben van, és normálisan már Col17a negatív.

A Col17a1 egy példa arra, hogy a tumorsejt környezettel való kapcsolata egyéb funkciókra is hatással van (növekedés, sejthalál, őssejtfunkció). Hasonlóan, a connexin fehérjék a sejtek közti "gap junction" csatornák vagy sejtközötti térrel közlekedő félcsatornák építőelemei, de ezektől független funkcióikat is leírták (193). Változó expressziójukat számos daganattípusban megfigyelték, ahol szerepet játszhatnak a sejtosztódás, sejthalál, tumorinvázió és áttétképzés szabályozásában egyaránt.

6.2 Connexinek változó expressziójának vizsgálata melanocytás daganatok progressziója során

Munkánkban a connexin-expressziót vizsgáltuk a melanocytás daganatok progressziója során, *in silico* adatok elemzésével, primer melanocyták, melanoma sejtvonalak, valamint a progresszió állomásait képviselő klinikai melanocytás tumorminták tanulmányozásával. Eredményeink változatos connexin izotípus-expressziót jeleztek a melanocytás daganatfejlődés során, beleértve a Cx43 elvesztését (áttétekben mérsékelt rekurrenciával), valamint a diffúz citoplazmatikus Cx26 szint emelkedését. Mind a Cx30.2, egy a melanocytákban is újonnan azonosított izotípus, mind a melanocytákból hiányzó Cx32 növekvő gyakoriságot mutatott paranukleáris reakció formájában a melanoma-progresszió során. Naevusokban a Cx43 és Cx32 sejtmembránra lokalizálódó jelenlétét a sejtciklusgátló $p16^{INK4a}$ fokozottabb kifejeződése és a CDK2 csökkenése kísérte. Viszont az intenzív intracelluláris Cx30.2-pozitivitást mutató melanomákban egyes poszt-G1 fázisfehérjék jelenléte fokozódott. A Cx43, Cx26 és Cx30 fehérjék felülreguláldtak a melanoma körüli epidermisben, valamint a Cx43 a tumort szegélyező nyirokerekben és vererekben is. Adataink arra utalnak, hogy a connexinek differenciált kifejeződése közreműködhet a melanocytás daganatok progressziójának szabályozásában, izotípus-változatosságuk pedig a progressziós csoportok közötti és csoportokon belüli heterogenitást tükrözheti, némileg eltérő geno- és fenotípusok, valamint mikrokörnyezeti interakciók miatt.

Primer melanocytákban a Cx43 és a Cx46 izotípusokat, valamint kisebb Cx26-ot és Cx30.2-t mutattunk ki, mind mRNS mind fehérje szinten. Azonban csak a Cx43 fehérjét

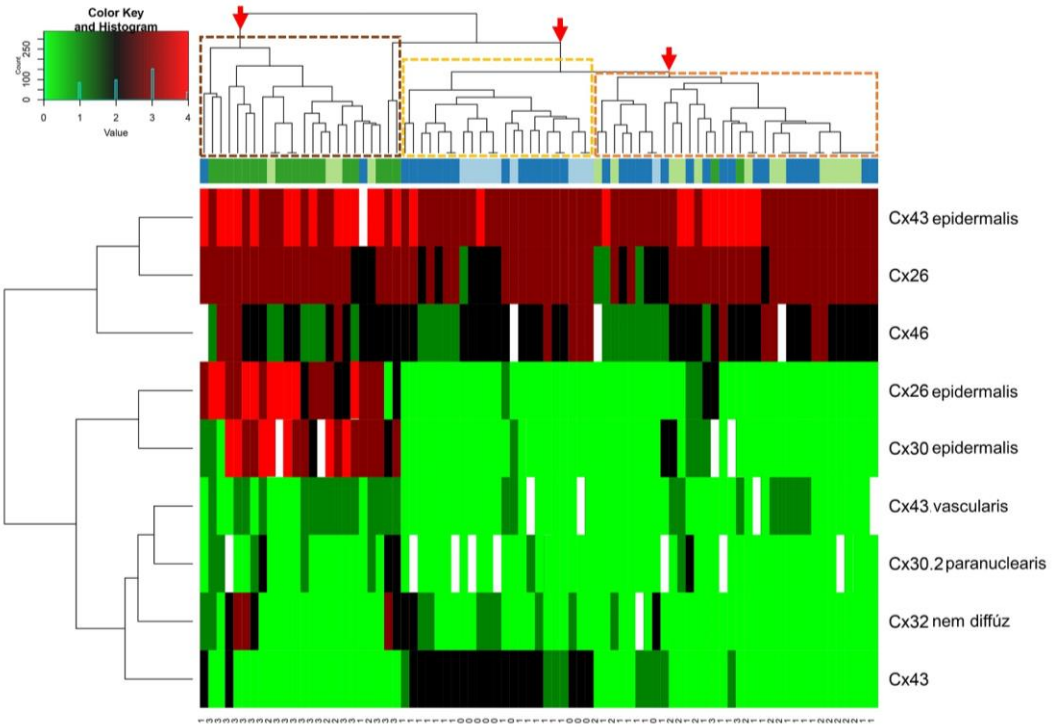
találtuk a sejtmembrához lokalizálva, aminek fontos szerepét a réskapcsolat-képzésben azzal is megerősítettük, hogy melanoma sejtvonalakban a hiánya tized-/századrészére csökkentette a sejtek közötti festéktranszfert (**16. ábra**), a citoplazmatikus Cx46, Cx32, Cx26 vagy Cx30.2 pozitivitás ellenére. A gyakori, kizárólagosan paranukleáris lokalizációja ezeknek az izotípusoknak (melanoma sejtvonalakban és szövetekben egyaránt) összhangban áll az endoplazmatikus retikulumban/ transz-Golgi-hálózatban való megrekedésükkel, megfelelő érésük hiányával (188). Más megközelítésben, a diffúz citoplazmatikus connexinek potenciálisan részt vehetnek intracelluláris fehérje-interakciókban és/vagy korlátozott membrántranszportban és csatornaképzésben egyaránt. Jelen munkánkban csak a „gap junction" funkciót vizsgáltuk, azonban félcsatornák és connexin fehérjeinterakciók is szerepet játszhatnak a tumorprogresszió során (186, 308).

A melanomák több irányba fejlődő klónokból épülnek fel, eltérő genetikai és epigenetikai károsodásokkal, kivételesen nagy daganaton belüli és daganatok közötti heterogenitással (309, 310). A daganatheterogenitást tükrözte, hogy három invazív metasztatikus melanoma sejtvonalban mRNS-szinten hét connexin-izotípust detektáltunk (GJA1/Cx43, GJB1/Cx32, GJB2/Cx26, GJA3/Cx46, GJB3/Cx31, GJC1/Cx45, GJC3/Cx30.2), közülük négyet fehérje szinten is (de Cx43-at nem, a Cx31 és Cx45 expresszió pedig bizonytalan volt). Ezeket a megfigyeléseket más vizsgálatok is támogatják, melyek a Cx32, Cx31 és Cx45 mRNS-ét a WM793B és 1205Lu emberi melanoma sejtvonalban igazolták (311), valamint humán melanoma esetekben a Cx43-at, Cx31-et, Cx31.1-et, Cx32-t (276), Cx26-ot, Cx30-at (277) és xenograftban a Cx46-ot is (278). Melanocytás daganatszövetekben megerősítettük a fenti connexin-izotípusok expresszióját, kivéve a Cx31-ét és Cx45-ét, melyek ellentmondásos western blot eredményei alkalmatlanok voltak az antitestek validálására az immuncito-/hisztokémia értékeléséhez. Fontos továbbá megjegyezni, hogy az expressziós array-ek adatait kritikusan kell kezelni, mivel legtöbbük nem lézer-mikrodisszekcióval izolált tiszta tumorsejtfrakciókon alapul (312). Ezek a minták kontaminálódhattak akár az epidermális keratinocytákból (pl. GJB3/Cx31, GJB5/Cx31.1, GJB6/Cx30), akár stromális mikrokörnyezeti komponensekből származó connexin mRNS-ekkel (313).

Néhány connexin-izotípus változó expressziója a melanocytás daganatprogresszió során, sőt a csoportokon belüli eltérések is ezt a heterogenitást tükrözhetik. Az eltérő connexin-

expresszió ugyancsak rávilágít a daganatsejtek és mikrokörnyezetük (stromális, endothelialis, epithelialis sejtek) kétirányú, dinamikus interakciójára és az ehhez való potenciális alkalmazkodásra (314). A connexinek rövid féléletideje lehetőséget biztosít gyors adaptációs válaszokra (188), így a pozitív sejtek aránya és a subcellularis lokalizáció gyakran különbözik a progressziós csoportok között. A főbb connexin-expressziós eredményeink hierarchikus csoportosítása primer melanocytás daganatszövetekben és mikrokörnyezetükben jól demonstrálja ezt a heterogenitást és diverzitást (**20. ábra**).

A részben eltérő jellegzetességek ellenére három fő csoportot sikerült elkülöníteni. Az elsőt a vastag melanomák uralták, a Cx43 elvesztésével, megnövekedett paranukleáris Cx30.2 és Cx32 pozitivitással, emellett fokozott epidermális Cx43, Cx26 és Cx30, valamint vaszkuláris Cx43 szinttel. A második csoport közönséges és dysplasticus



20. ábra. Connexin izotípusok expressziójának súlyozatlan hiararchikus klaszteranalízise melanocytás daganatszövetekben és mikrokörnyezetükben. Az ábrázolás, amellett, hogy demonstrálta a daganatheterogenitást, három csoportot (nyilak) választ szét egymástól: 1.) Vastag (sötétzöld) és vékony (világoszöld) melanomák (barna keret); 2.) közönséges (világoskék) és dysplasticus naevusok (sötétkék) (narancssárga keret); 3.) egy vegyes csoport vékony melanomákkal és dysplasticus naevusokkal (világosbarna keret). A hiányos adatokat fehérrel jelöltük.

naevusokat foglalt magába, melyeket mind a tumorban, mind a környező epidermisben Cx43 expresszió jellemzett, hiányzó epidermális Cx26 és Cx30 fehérjékkel. A harmadik csoport pedig dysplasticus naevusok és vékony melanomák keveréke volt, többnyire Cx43-negativitással mind a daganatban, mind a mikrokörnyezetben, gyakorlatilag Cx30.2 expresszió nélkül. Ez a mintázat egy funkcionális folytonosságot sugallt néhány dysplasticus naevus és vékony melanoma között, összhangban a klinikai megfigyelésekkel, rámutatva, hogy a dysplasticus naevusok a melanomák prekurzorai lehetnek (315). Azon megfigyelésünk, hogy a daganaton belüli connexinek közül a Cx43 expressziója mutatta messze a legszignifikánsabb redukciót a benignustól a malignus elváltozások felé, összhangban van azokkal a funkcionális tanulmányokkal, melyek a Cx43 megkülönböztetett jelentőségét, mint fő tumorszuppresszor izotípus, bizonyították (többnyire direkt kommunikációs csatornákat formálva) (229, 234, 316). Erre további indirekt bizonyíték a membránhoz kötött Cx43 koncentrálódása a centrális és vertikális naevusrégiókra, összhangban azok érésének ismert folyamatával (317) (**14/C-D. ábra**). Megfigyelésünk szerint naevusokban a Cx43 expressziója a CDK2 sejtciklusfehérje alacsonyabb szintjével és a G1-fázist gátló $p16^{INK4a}$ fokozottabb kifejeződésével járt együtt, ami megerősíteni látszott proliferációgátló szerepét. Ez egybecseng korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint a connexinek jellemzően a G1-fázisban szabályozzák a sejtciklus működését (185, 193, 242). A Cx43 nagy fokú redukciója (2%-ra) a malignus transzformáció során, viszont sejtplazmai re-expressziója a metasztázisokban (11%) azonban kettős szerepet sugall: részvételt a tumorszuppresszióban, de ugyanakkor az áttéti adaptációban is. Ezt támogatja a festéktranszfer vizsgálatunk, ahol a vertikális növekedési fázisú melanoma sejtvonal (WM983/A) lényegesen kevesebb kapcsolódást mutatott, mint a metasztázisokból származók (HT199, A2058). Ezek az adatok részben összecsengenek egy vizsgálattal, amely kimutatta, hogy a primer melanomák Cx43-negatívak, míg az áttéteik képesek a fehérjét termelni, noha valószínűleg réskapcsolat kialakítása nélkül, csatornafüggetlen molekuláris interakciókat támogatva (318). Közölt eredmények támasztják alá, hogy a citoplazmatikus Cx43 fehérje befolyásolja a sejtfunkciókat több tucatnyi szabályozó molekulával együttműködve (186).

Elsőként azonosítottuk melanoma sejtvonalakban a Cx32-t együttesen mRNS- és fehérjeszinten. Noha a Cx32 átiratait melanomákban már más munkacsoportok is leírták (276, 311), mi három különböző TaqMan próbával és western blottal hitelesített

antitesttel egyértelműen bizonyítottuk a jelenlétét melanoma sejtvonalakban és immunhisztokémiával klinikai tumorszövetekben is. Érdekes, hogy az 1. és 3. exonon átívelő szakaszt célzó próbánk nem detektálta a GJB1 mRNS-ét a metasztatikus eredetű HT199-ben és A2058-ban (de a vertikális fázisból eredő WM983/A-ban igen), míg a 2. exonról átírt szakaszt célzó próba mindhárom melanoma vonalban erős pozitivitást mutatott. A paradoxont talán a GJB1 átiratának alternatív hasításai („alternative splicing") magyarázhatják, melyek összefüghetnek a daganatprogresszióval. Nem kizárt, hogy ugyancsak ez a mechanizmus áll annak hátterében is, hogy míg naevus és vékony melanoma szövetminták egy részében a Cx32 kihelyeződött a plazmamembránra, addig vastag és áttéti melanomákban a fehérje transzportja sokszor paranukleárisan megrekedt, feltételezhetően az endoplazmás retikulumokban és/vagy a Golgi-testekben. A membranózus Cx32 expresszió mind naevusokban, mind melanomákban összefüggést mutatott a $p16^{INK4a}$ sejtciklusgátló szintjének fokozódásával és a G1/S fázisban működő CDK2 csökkenésével. A sejthártyán Cx32-t kifejező naevusok egyúttal mind Cx43-pozitívak is voltak, azonban mivel alfa- és béta-családba tartozó izotpusok között nem alakulhat ki heteromer connexincsatorna (145), a sejtmembránban külön helyezkedhetnek el a Cx43 és Cx32 típusú connexonok. Megfigyelésünk szerint sejtciklussal való összefüggésük azonban közös: a G1-fázisban való proliferációgátlásra utal. Paranuclearis Cx32-expressziót mutató vastag és áttéti melanomákban ezt az összefüggést nem tudtuk kimutatni a sejtciklus-szabályozókkal, így feltételezzük, hogy az intracellulárisan megrekedt fehérje nem tud kifejteni proliferációgátló hatást. Ezek a megfigyeléseink egybecsengenek mások közleményeivel, hogy míg a Cx32 általában gátolja a sejtciklust (247, 248, 262), addig intracellulárisan akkumulálódva a daganat agresszivitását propagálhatja (251).

A Cx30.2 fehérje, melyet elsőként mi azonosítottunk melanocytában és elváltozásaiban (ez a génpróba hiányzott az expressziós array-ekben) (276-278), szignifikánsan gyakoribb volt malignus, mint benignus daganatokban, azonban ezt csak néhány eset alapján tudtuk igazolni. Megfigyelésünk szerint ezek között a melanomaminták között fokozott volt bizonyos poszt-G1 fázisfehérjék expressziója (Top2a, aurora A és B). Mindezek alapján a ritka, erősen Cx30.2-pozitív melanomák egy klinikailag releváns, feltehetően gyors növekedésű altípust reprezentálhatnak, és további vizsgálatot érdemelnének. Megjegyzendő, hogy halovány paranukleáris Cx30.2 fehérjeexpressziót

tenyésztett melanocytákban is kimutattunk, ahol ez mRNS szinten is azonosítható volt (akárcsak valamennyi vizsgált melanoma sejtvonalban), tehát az izotípus alacsony szintű jelenléte gyakoribb lehet, mint amit szövetmintáinkban detektálni tudtunk. Egérben a GJC3 által kódolt Cx29 fehérjét (mely a humán Cx30.2 ortológja) Schwann-sejtekben mutatták ki, melyek fejlődéstanilag a melanocytákhoz hasonlóan dúcléc eredetűek (240), ez magyarázhatja a Cx30.2 eredetét melanocytás elváltozásokban.

A Cx43 felülregulációja a melanomához kapcsolódó érendotheliumokban támogatja azt a nézetet, miszerint a connexin kommunikációs csatornák részt vesznek a daganat intra- és extravazációjának szabályozásában az áttéti szóródás során, amit már többen megfigyeltek melanomán kívül pl., emlő- és prosztatarákban is (215, 319, 320). Kísérletesen a Cx43 kémiai vagy RNS-interferencián alapuló gátlásával az emőráksejtek extravazációja gátolható volt (185, 215, 321). Utóbbi módszerrel a Cx26 blokkolása is hasonló eredménnyel járt (215).

A melanomasejtek függetlenednek a keratinocyták általi közvetlen proliferáció-szabályozás alól, a direkt sejtközötti interakciók – kalcium-függő sejtadhézió (E-cadherin, P-cadherin, desmoglein), connexinek – deregulációjával (322). A Cx26 és Cx30 indukciója a melanoma körüli keratinocytákban a daganatok mikrokörnyezetükre kifejtett hatásának eredménye, melyet valószínűleg szolubilis faktorok közvetítenek (314). Ez összhangban áll mások korábbi közleményeivel, továbbá differenciáldiagnosztikai jelentősége is lehet, mivel jóindulatú naevusokban nem figyelhető meg a jelenség (231). Leírták a Cx26 és Cx30 felülregulációjának pozitív korrelációját a keratinocyták proliferációjával (230), amit a melanomák által termelt TGF-α irányíthat (314). A Cx26 és Cx30 kifejeződésének stimulációját leírták a korai sebgyógyulás során is, ahol az epidermis újraképződéséhez ugyancsak a keratinocyták proliferációja szükséges (198, 323).

A Cx43 réskapcsolatok ismert gátlói a sejtosztódásnak, és ezzel magyarázzák, miért regulálódnak alul a korai sebgyógyulás során, ahol a keratinocyták proliferációja nélkülözhetetlen (323). Ellenkezőleg, a krónikus sebeknél felülregulálódott Cx43 késlelteti a gyógyulást, ezért specifikus gátlása connexin-mimetikus peptidekkel vagy antiszenz oligonukleotidokkal fázis III vizsgálatokban ígéretesnek bizonyult a krónikus diabéteszes bőrsebek gyógyításában (324). Mivel a legtöbb vastag melanoma mintánk

exulcerált volt, a környező epidermis Cx43 expressziójának fokozódása valószínűleg a krónikus bőrsebbel magyarázható (325).

Összegzésként, a differenciált minőségű és mennyiségű, változó connexin-expresszió, amit munkánk igazolt, valószínűleg a melanocytás daganatok ismert heterogenitásából fakad. A melanoma fejlődésének legkiemelkedőbb jellegzetessége a Cx43-expresszió elvesztése a malignus transzformáció során, és mérsékelt visszatérése az áttétes melanomákban, amit a változó metabolikus kommunikáció határoz meg. A connexin-expresszión alapuló hierarchikus klaszteranalízis támogatja a nézetet, miszerint a dysplasticus naevusok a malignus transzformáció rizikófaktorai ill. prekurzorai, mivel néhányuk közös csoportba került a vékony melanomákkal. A melanocytás daganatok membranózus Cx43 és Cx32 expressziója, valamint a sejtciklus propagációja között negatív összefüggést figyeltünk meg, amit a connexinek és réskapcsolatok ismert tumorszuppresszor hatása magyarázhat. A paranukleáris Cx30.2-pozitivitást ugyanakkor a poszt-G1 fázismarkerek fokozódása kísérte. A diffúz citoplazmatikus Cx26, paranukleáris Cx32 és Cx30.2 emelkedése a melanoma-progresszió során a csatornafüggetlen funkciókra utalhatnak, míg az indukált Cx43, Cx26 és Cx30 fehérjék a melanoma körüli epidermisben, valamint a Cx43 emelkedése a daganatot övező vaszkuláris endotheliumban a kétirányú adaptív interakciókat tükrözhetik daganat és mikrokörnyezete között.

7 Következtetések, új megfigyelések

A sejtciklusfrakciók (G1, S-G2, G2-M) *in situ*, szisztémás összehasonlító vizsgálatát melanocytás daganatok progressziója során elsőként végeztük el, mely során megállapítottuk, hogy:

1. A dysplasticus naevusokban szignifikánsan több a korai sejtciklusmarkerrel (cyclin D1, CDK2) pozitív tumorsejt, mint a közönséges naevusokban. Az S-G2 fázismarkerek hiánya a replikáció megrekedésére utal G1 fázisban.
2. A poszt-G1 fázismarkerek (cyclin A, geminin, topoizomeráz II alfa, aurora kináz B) először vékony melanomákban jelennek meg, így a malignitás indikátorai lehetnek.
3. Az MCM6 relatív magas gyakorisága (sejtek >10%-a) már alacsony (>1%) Ki67 pozitivitás mellett megnöveli a melanoma valószínűségét, ezt tovább erősítheti akár csupán alacsony (>1%) cyclin A vagy más poszt-G1 fázis-marker. Így a vékony melanomák, ill. dysplasticus naevusok 95,9%-a, 89,5%-os szenzitivitással és 92,6%-os specificitással elkülöníthető.
4. A poszt-G1 fázismarkerek progresszív expressziót mutatnak a dysplasticus naevus (negatív)–vékony melanoma–vastag melanoma sorozat mentén, többségük a vastag, vertikális növekedésű melanomákban tetőzött.

Bár egyes connexin izotípusok eltűnését, ill. megjelenését melanomában már leírták, melanocytás daganatok progressziója során ezt szisztémásan mi vizsgáltuk először. Megállapítottuk, hogy:

1. A primer melanocyták GJA1/Cx43, GJA3/Cx46 és alacsony szinten GJB2/Cx26 és GJC3/Cx30.2 mRNS-t expresszálnak, ám közülük csupán a Cx43 fehérje lokalizálódik a sejtmembránon, kommunikációs csatornákat képezve. Elsőként azonosítottuk a GJC3/Cx30.2 izotípust melanocytákban és melanomákban, ill. a GJB1/Cx32 fehérjét melanomákban.
2. A melanocytás daganatfejlődést heterogén connexin izotípus-expresszió, így a Cx43 elvesztése, a diffúz citoplazmatikus Cx26 termelés emelkedése, ill. a Cx30.2 és Cx32 növekvő gyakoriságú paranukleáris reakciója jellemzi.
3. A Cx43 és Cx32 expresszióját naevusok sejtmembránján a sejtciklusgátlásra utaló fokozottabb $p16^{INK4a}$ és alacsonyabb CDK2 immunreakció kíséri, míg

melanomákban a Cx30.2 izotípus jelenlétével poszt-G1 fázis fehérjék mutatnak pozitív összefüggést, ami intenzívebb proliferációt sugall.

4. A connexinek melanomában ritkán képeznek direkt kommunikációs csatornákat, amire membránreakcióik hiánya és a sejtvonalakban megfigyelt alacsony mértékű festéktranszfer utal.
5. A melanomák epidermális mikrokörnyezetében a Cx43, Cx26 és Cx30, a környező nyirok- és vererekben pedig a Cx43 expresszió felülreguláldik. Így klinikai szövetmintákban a neoplasztikus sejtek és mikrokörnyezetük connexin-mintázata alapján három fő klaszter különíthető el: a) vastag melanomák, b) közönséges és dysplasticus naevusok, ill. 3) dysplasticus naevusok és vékony melanomák.

8 Összefoglalás

A melanoma fejlődése során a sejtciklus-szabályozás és „upstream” növekedési útvonalak deregulációja fokozott sejtreplikációhoz vezet. Munkánkban jó- és rosszindulatú melanocytás daganatokban vizsgáltuk a főbb sejtciklusfázis-frakciókat. A poszt-G1 fázismarkerek (cyclin A, geminin, topoizomeráz II alfa és aurora kináz B) vékony melanomákban (≤ 1 mm) már expresszálódtak, de dysplasticus naevusokban még nem. A korai markerek [cyclin D1, cyclin-dependens kináz 2 valamint a „minichromosome maintenance protein” 6 (MCM6)] nem, de a poszt-G1 fázismarkerek és a Ki67 szignifikánsan gyakrabban fejeződött ki vastag (> 1 mm), mint vékony melanomákban. A cyclin A detektálását az MCM6-éval és Ki67-ével kombinálva helyesen tudtuk osztályozni a vékony melanomák és dysplasticus naevusok 95,9%-át (eredeti mintákban), ill. 93,2%-át (keresztvalidált csoportokkal), 89,5%-os szenzitivitással és 92,6%-os specificitással. Következtetésünk az, hogy a sejtciklus-fázismarkerek kimutatásával már korai elváltozásokban is azonosítható a malignitás, valamint hogy a melanoma vertikális növekedési fázisában tovább fokozódik a sejtciklusprogresszió.

Connexinek (Cx) mutációja daganatokban ritka, de szabályozó szerepüket daganatokban is igazolták. Eredményeink szerint a primer melanocyták a GJA1/Cx43, GJA3/Cx46 és alacsony szinten a GJB2/Cx26 és GJC3/Cx30.2 mRNS-t expresszálták. Három melanoma sejtvonalban kimutattuk a GJA1/Cx43 hiányát és a GJB2/Cx26, GJB1/Cx32, GJA3/Cx46 és GJC3/Cx30.2 változékony expresszióját. A connexinek paranukleáris lokalizációja összhangban van a melanoma-sejtvonalakban huszadára csökkent direkt sejtkommunikációval, melanocytákhoz képest. Klinikai melanoma esetekben megerősítettük a Cx43 fehérje eltűnését, a sejtmembránra lokalizált Cx32 csökkenését (fokozódó paranukleáris jelenlét mellett), ill. a mérsékelten emelkedő citoplazmatikus Cx26 és paranukleáris Cx30.2 pozitivitást. A melanoma körüli epidermisben a Cx43, Cx26 és Cx30, míg a daganathatároló erekben a Cx43-expresszió felülregulációját figyeltük meg. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a connexinek részt vehetnek a melanocytás tumorprogresszió szabályozásában. Izotípusaik differenciált expressziója a melanomák intra-, ill. intertumorális heterogenitását, ill. a mikrokörnyezettel való kétirányú adaptív kapcsolat kialakítását tükrözi.

9 Summary

Impaired regulation of cell signaling pathways controlling the cell cycle is a hallmark of the development and progression of melanoma. In present work, the main cell cycle phase fractions were examined in a set of benign and malignant melanocytic tumors. Post-G1 phase markers cyclin A, geminin, topoisomerase II alpha, and aurora kinase B were already observed in thin (≤ 1 mm) melanomas but not in dysplastic nevi. Post-G1 phase markers and Ki67 but not the early markers (cyclin D1, CDK2, and minichromosome maintenance protein 6 - MCM6) were expressed more frequently in thick (> 1 mm) melanomas compared to the thinner ones. Combined detection of cyclin A, MCM6, and Ki67 was able to properly classify 95.9% (original cases) or 93.2% (cross-validated groups) of thin melanomas and dysplastic nevi with 89.5% sensitivity and 92.6% specificity. We conclude that examination of cell cycle markers can indicate malignancy even in early lesions, and that cell cycle progression further increases in the vertical growing phase of melanomas.

Connexin (Cx) gene mutations are rare in tumors, but their regulating functions in malignancies has already been confirmed. Our results showed that primary melanocytes express GJA1/Cx43, GJA3/Cx46, and in lower amounts GJB2/Cx26 and GJC3/Cx30.2. In three melanoma cell lines, absence of GJA1/Cx43 and variable expression of GJB2/Cx26, GJB1/Cx32, GJA3/Cx46 and GJC3/Cx30.2 was observed. Paranuclear predominance of connexin proteins was in consistence with the 20-fold decrease in the intercellular communication via gap junctions in melanoma cell lines compared to melanocyte cultures. In clinical melanoma tissues, we confirmed the loss of Cx43 protein, as well as the decrease of membranous Cx32 (accompanied by increased paranuclear positivity), the mild increase of cytoplasmatic Cx26 positivity, and the paranuclear localization of Cx30.2. In the epidermis adjacent to melanoma, we detected the upregulation of Cx43, Cx26, and Cx30, and in the surrounding vessels the increase in Cx43 expression. Our results may suggest that connexins have role in melanocytic tumor progression. The varying expression of their isotypes reflects tumor heterogeneity, even in relation to bidirectional adaptive interactions with the microenvironment.

10 Irodalomjegyzék

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer, 127: 2893-2917.
2. Bolognia JL, Orlow SJ. Melanocyte biology. In: Bolognia JL JJ, Schaffer JV (szerk.), Dermatology. Elsevier, Hollandia, Amszterdam, 2012: 1011-1022.
3. Shain AH, Bastian BC. (2016) From melanocytes to melanomas. Nat Rev Cancer, 16: 345-358.
4. Lin JY, Fisher DE. (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature, 445: 843-850.
5. Prasad MS, Charney RM, García-Castro MI. (2019) Specification and formation of the neural crest: Perspectives on lineage segregation. Genesis, 57: e23276.
6. Vandamme N, Berx G. (2019) From neural crest cells to melanocytes: cellular plasticity during development and beyond. Cell Mol Life Sci, 76: 1919-1934.
7. Furlan A, Adameyko I. (2018) Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? Dev Biol, 444 Suppl 1: S25-s35.
8. Otto T, Sicinski P. (2017) Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. Nat Rev Cancer, 17: 93-115.
9. Rottman G. (2006) Measurement of total and spectral solar irradiance. Space Sci Rev, 125: 39-51.
10. Lerche CM, Philipsen PA, Wulf HC. (2017) UVR: sun, lamps, pigmentation and vitamin D. Photochem Photobiol Sci, 16: 291-301.
11. McDaniel D, Farris P, Valacchi G. (2018) Atmospheric skin aging-Contributors and inhibitors. J Cosmet Dermatol, 17: 124-137.
12. Giordano CN, Yew YW, Spivak G, Lim HW. (2016) Understanding photodermatoses associated with defective DNA repair: Syndromes with cancer predisposition. J Am Acad Dermatol, 75: 855-870.
13. Non-melanoma skin cancer. In: Boyle P, Levin B (szerk.), World Cancer Report 2008. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Franciaország, Lyon, 2008: 398-403.

14. Cutaneous melanoma. In: Boyle P, Levin B (szerk.), World Cancer Report 2008. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Franciaország, Lyon, 2008: 404-411.
15. Sitek A, Rosset I, Żądzińska E, Kasielska-Trojan A, Neskoromna-Jędrzejczak A, Antoszewski B. (2016) Skin color parameters and Fitzpatrick phototypes in estimating the risk of skin cancer: A case-control study in the Polish population. J Am Acad Dermatol, 74: 716-723.
16. Agbai ON, Buster K, Sanchez M, Hernandez C, Kundu RV, Chiu M, Roberts WE, Draelos ZD, Bhushan R, Taylor SC, Lim HW. (2014) Skin cancer and photoprotection in people of color: a review and recommendations for physicians and the public. J Am Acad Dermatol, 70: 748-762.
17. Brenner M, Hearing VJ. (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochem Photobiol, 84: 539-549.
18. Iványi A. Bőrpatológia. In:Kopper L, Schaff Zs (szerk.), Patológia 2. Medicina, Budapest, 2006: 1317-1369.
19. Gilde K. (2003) A naevus pigmentosus és a melanoma. Magy Onkol, 47: 19-26.
20. Buendía-Eisman A, Paláu-Lázaro MC, Arias-Santiago S, Cabrera-León A, Serrano-Ortega S. (2012) Prevalence of melanocytic nevi in 8- to 10-year-old children in Southern Spain and analysis of associated factors. J Eur Acad Dermatol Venereol, 26: 1558-1564.
21. Crane LA, Mokrohisky ST, Dellavalle RP, Asdigian NL, Aalborg J, Byers TE, Zeng C, Barón AE, Burch JM, Morelli JG. (2009) Melanocytic nevus development in Colorado children born in 1998: a longitudinal study. Arch Dermatol, 145: 148-156.
22. Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, Cuzick J. (1996) Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. Br J Cancer, 73: 1605-1611.
23. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, Noe MC, Diconstanzo MP, Bonerandi JJ. (1990) Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. Cancer, 66: 387-395.

24. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet, 33: 19-20.
25. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. (2015) The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. N Engl J Med, 373: 1926-1936.
26. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature, 436: 720-724.
27. Crutcher WA, Sagebiel RW. (1984) Prevalence of dysplastic naevi in a community practice. Lancet, 1: 729.
28. Liszkay G. (2015) A melanóma diagnosztikájának fejlődése. Magy Onkol, 59: 68-72.
29. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cognetta AB, Vogt T, Landthaler M, Bilek P, Braun-Falco O, Plewig G. (1994) The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. J Am Acad Dermatol, 30: 551-559.
30. NIH Consensus Development Conference. (1992) Diagnosis and treatment of early melanoma. Consens Statement, 10: 1-25.
31. de Wit PE, van't Hof-Grootenboer B, Ruiter DJ, Bondi R, Bröcker EB, Cesarini JP, Hastrup N, Hou-Jensen K, MacKie RM, Scheffer E, et al. (1993) Validity of the histopathological criteria used for diagnosing dysplastic naevi. An interobserver study by the pathology subgroup of the EORTC Malignant Melanoma Cooperative Group. Eur J Cancer, 29a: 831-839.
32. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, Hersey P, Cuzick J. (1998) The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. Br J Cancer, 77: 505-510.

33. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. (2010) Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma. Cancer Prev Res (Phila), 3: 233-245.
34. Melanoma. In: Kopper L, Tímár J, Becságh P (szerk.), Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. Semmelweis, Budapest, 2015: 191-195.
35. Bishop JA, Wachsmuth RC, Harland M, Bataille V, Pinney E, Mac KP, Baglietto L, Cuzick J, Bishop DT. (2000) Genotype/phenotype and penetrance studies in melanoma families with germline CDKN2A mutations. J Invest Dermatol, 114: 28-33.
36. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2019). World Population Prospects 2019, Online Edition. Rev. 1. https://population.un.org/wpp/
37. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. (2019) Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer, 144: 1941-1953.
38. Green A, Battistutta D, Hart V, Leslie D, Weedon D. (1996) Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. The Nambour Study Group. Am J Epidemiol, 144: 1034-1040.
39. Dimitriou F, Krattinger R, Ramelyte E, Barysch MJ, Micaletto S, Dummer R, Goldinger SM. (2018) The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. Curr Oncol Rep, 20: 87.
40. Sugárterápiás és Onkológiai Szakmai Kollégium. (2008) Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a melanoma malignum ellátásáról. Egészségügyi Közlöny, 58: 2574-2592.
41. Szentirmay Z, Szőke J, Tímár J, Tóth E. Daganatepidemiológia: incidencia és mortalitás hazánkban. In: Kásler M (szerk.), Az onkológia alapjai. Medicina, Budapest, 2018: 89-90.
42. Kraljik N, Rosso M, Sepić T, Males J, Vranjes Z, Kondza G. (2010) Epidemiologic data of malignant melanoma in Osijek-Baranya County (Eastern Croatia) during the period of 2000-2008. Coll Antropol, 34 Suppl 2: 39-43.

43. Wu S, Han J, Laden F, Qureshi AA. (2014) Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 23: 1080-1089.
44. Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. (2018) Melanoma: What do all the mutations mean? Cancer, 124: 3490-3499.
45. Sullivan RJ, Fisher DE. (2019) The molecular biology of melanoma. UpToDate. Wolters Kluwer N.V., Hollandia, Alphen aan den Rijn. Változat: 2019.05.06. https://www.uptodate.com/contents/the-molecular-biology-of-melanoma
46. Balla P. (2016) Az epidermális növekedési faktor receptor jelút és connexin 43 kommunikációs csatornák szerepe az óriássejtes csonttumor progesszió jában. Doktori értekezés. Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem, Budapest
47. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, Tiwari S, Kong L, Hanrahan AJ, Yao Z, Merghoub T, Ribas A, Chapman PB, Yaeger R, Taylor BS, Schultz N, Berger MF, Rosen N, Solit DB. (2014) Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. Cancer Res, 74: 2340-2350.
48. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. (2003) NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. Clin Cancer Res, 9: 6483-6488.
49. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, McCusker JP, Ma S, Cheng E, Straub R, Serin M, Bosenberg M, Ariyan S, Narayan D, Sznol M, Kluger HM, Mane S, Schlessinger J, Lifton RP, Halaban R. (2015) Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. Nat Genet, 47: 996-1002.
50. Cancer Genome Atlas Network. (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell, 161: 1681-1696.
51. Molekuláris hibák a jelutakban. In:Kopper L TJ, Becságh P (szerk.), Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. Semmelweis, Budapest, 2015: 74-140.
52. Prasad CP, Mohapatra P, Andersson T. (2015) Therapy for BRAFi-Resistant Melanomas: Is WNT5A the Answer? Cancers (Basel), 7: 1900-1924.

53. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. (2004) Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. Cancer Res, 64: 7002-7010.
54. Bertolotto C. (2013) Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. Scientifica (Cairo), 2013: 635203.
55. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. (2004) Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. J Invest Dermatol, 122: 337-341.
56. Gajos-Michniewicz A, Czyz M. (2020) WNT Signaling in Melanoma. Int J Mol Sci, 21: 4852.
57. Tang L, Li G, Tron VA, Trotter MJ, Ho VC. (1999) Expression of cell cycle regulators in human cutaneous malignant melanoma. Melanoma Res, 9: 148-154.
58. Bennett DC. (2008) How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? Pigment Cell Melanoma Res, 21: 27-38.
59. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. Cell, 150: 251-263.
60. Mehrotra A, Mehta G, Aras S, Trivedi A, de la Serna IL. (2014) SWI/SNF chromatin remodeling enzymes in melanocyte differentiation and melanoma. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 24: 151-161.
61. Meyer LJ, Zone JH. (1994) Genetics of cutaneous melanoma. J Invest Dermatol, 103: 112s-116s.
62. Eliason MJ, Larson AA, Florell SR, Zone JJ, Cannon-Albright LA, Samlowski WE, Leachman SA. (2006) Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families. J Invest Dermatol, 126: 660-666.
63. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, Azizi E, Bergman W, Bianchi-Scarra G, Bruno W, Calista D, Albright LA, Chaudru V,

Chompret A, Cuellar F, Elder DE, Ghiorzo P, Gillanders EM, Gruis NA, Hansson J, Hogg D, Holland EA, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Leachman SA, MacKie RM, Magnusson V, Mann GJ, Bishop JN, Palmer JM, Puig S, Puig-Butille JA, Stark M, Tsao H, Tucker MA, Whitaker L, Yakobson E. (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. J Med Genet, 44: 99-106.

64. Rulyak SJ, Brentnall TA, Lynch HT, Austin MA. (2003) Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. Cancer, 98: 798-804.

65. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. Nat Genet, 12: 97-99.

66. Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C. (2017) A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. J Am Acad Dermatol, 77: 938-945.e934.

67. Bastian BC. (2014) The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Annu Rev Pathol, 9: 239-271.

68. Cormier JN, Xing Y, Ding M, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE, Ross MI, Du XL. (2006) Ethnic differences among patients with cutaneous melanoma. Arch Intern Med, 166: 1907-1914.

69. Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkievicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Strobel W, Garbe C. (2006) The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. Cancer, 107: 1331-1339.

70. Swetter SM, Boldrick JC, Jung SY, Egbert BM, Harvell JD. (2005) Increasing incidence of lentigo maligna melanoma subtypes: northern California and national trends 1990-2000. J Invest Dermatol, 125: 685-691.

71. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF. (2012) Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol, 30: 2678-2683.

72. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer, 77: 1303-1310.
73. Imrédi E. (2019) Aquaporin-1 expresszió jelentősége kután melanoma metasztatikus progressziója során. Doktori értekezés. Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem, Budapest
74. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. (2007) Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol, 25: 869-875.
75. Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. (1996) Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. Cancer, 78: 427-432.
76. Schmoeckel C, Braun-Falco O. (1978) Prognostic index in malignant melanoma. Arch Dermatol, 114: 871-873.
77. Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong S, McCarthy WH, Tinoco L, Mansfield P, Lee JE, Bedikian A, Eton O, Plager C, Papadopoulos N, Legha SS, Benjamin RS. (1997) Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. J Clin Oncol, 15: 1039-1051.
78. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol, 27: 6199-6206.
79. Demierre MF, Chung C, Miller DR, Geller AC. (2005) Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. Arch Dermatol, 141: 745-750.
80. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res, 29: 705-727.

81. Stadelmeyer E, Heitzer E, Resel M, Cerroni L, Wolf P, Dandachi N. (2014) The BRAF V600K mutation is more frequent than the BRAF V600E mutation in melanoma in situ of lentigo maligna type. J Invest Dermatol, 134: 548-550.
82. Gloster HM, Jr., Neal K. (2006) Skin cancer in skin of color. J Am Acad Dermatol, 55: 741-760; quiz 761-744.
83. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. (2006) Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. Mod Pathol, 19 Suppl 2: S71-87.
84. Breslow A. (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg, 172: 902-908.
85. Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. (1987) Thin malignant melanomas with regression and metastases. Arch Dermatol, 123: 1326-1330.
86. Zugna D, Senetta R, Osella-Abate S, Fierro MT, Pisacane A, Zaccagna A, Sapino A, Bataille V, Maurichi A, Picciotto F, Cassoni P, Quaglino P, Ribero S. (2018) Favourable prognostic role of histological regression in stage III positive sentinel lymph node melanoma patients. Br J Cancer, 118: 398-404.
87. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. J Natl Cancer Inst, 81: 1893-1904.
88. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF. (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin, 67: 472-492.
89. Balch CM, Soong S, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, Mihm MC, Barnhill RL, Jewell WR, Wanebo HJ, Harrison R. (2000) Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. Ann Surg Oncol, 7: 87-97.
90. Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U. (2019) Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Ann Oncol, 30: 1884-1901.

91. Guo J, Carvajal RD, Dummer R, Hauschild A, Daud A, Bastian BC, Markovic SN, Queirolo P, Arance A, Berking C, Camargo V, Herchenhorn D, Petrella TM, Schadendorf D, Sharfman W, Testori A, Novick S, Hertle S, Nourry C, Chen Q, Hodi FS. (2017) Efficacy and safety of nilotinib in patients with KIT-mutated metastatic or inoperable melanoma: final results from the global, single-arm, phase II TEAM trial. Ann Oncol, 28: 1380-1387.

92. Valpione S, Carlino MS, Mangana J, Mooradian MJ, McArthur G, Schadendorf D, Hauschild A, Menzies AM, Arance A, Ascierto PA, Di Giacomo A, de Rosa F, Larkin J, Park JJ, Goldinger SM, Sullivan RJ, Xu W, Livingstone E, Weichenthal M, Rai R, Gaba L, Long GV, Lorigan P. (2018) Rechallenge with BRAF-directed treatment in metastatic melanoma: A multi-institutional retrospective study. Eur J Cancer, 91: 116-124.

93. Davies MA, Liu P, McIntyre S, Kim KB, Papadopoulos N, Hwu WJ, Hwu P, Bedikian A. (2011) Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. Cancer, 117: 1687-1696.

94. Rigel DS, Friedman RJ. (1993) The rationale of the ABCDs of early melanoma. J Am Acad Dermatol, 29: 1060-1061.

95. Rigel DS, Russak J, Friedman R. (2010) The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. CA Cancer J Clin, 60: 301-316.

96. Annessi G, Bono R, Sampogna F, Faraggiana T, Abeni D. (2007) Sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of three dermoscopic algorithmic methods in the diagnosis of doubtful melanocytic lesions: the importance of light brown structureless areas in differentiating atypical melanocytic nevi from thin melanomas. J Am Acad Dermatol, 56: 759-767.

97. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. (1998) Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. Mod Pathol, 11: 740-746.

98. Szekeres G, Battyáni Z. (2003) A malignus melanoma immundiagnosztikája. Magy Onkol, 47: 45-50.

99. Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. (2013) SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 21: 506-510.

100. Brochez L, Verhaeghe E, Grosshans E, Haneke E, Piérard G, Ruiter D, Naeyaert JM. (2002) Inter-observer variation in the histopathological diagnosis of clinically suspicious pigmented skin lesions. J Pathol, 196: 459-466.
101. Troxel DB. (2003) Pitfalls in the diagnosis of malignant melanoma: findings of a risk management panel study. Am J Surg Pathol, 27: 1278-1283.
102. Duffy K, Grossman D. (2012) The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part II. Molecular aspects and clinical management. J Am Acad Dermatol, 67: 19.e11-12; quiz 31-12.
103. Rabkin MS. (2008) The limited specificity of histological examination in the diagnosis of dysplastic nevi. J Cutan Pathol, 35 Suppl 2: 20-23.
104. Googe PB, Flanigan KL, Miedema JR. (2021) Preferentially Expressed Antigen in Melanoma Immunostaining in a Series of Melanocytic Neoplasms. Am J Dermatopathol (kiadás előtt, doi:10.1097/dad.0000000000001885).
105. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS, Hollmann TJ, Busam KJ. (2018) PRAME Expression in Melanocytic Tumors. Am J Surg Pathol, 42: 1456-1465.
106. Principles of Sentinel Lymph Node Biopsy (SLNB). In: National Comprehensive Cancer Network (szerk.) (2021), Melanoma: Cutaneous. NCCN, USA, PA, Plymouth Meeting, 2.2021: ME-F 3 of 3. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma.pdf
107. Williams GH, Stoeber K. (2012) The cell cycle and cancer. J Pathol, 226: 352-364.
108. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144: 646-674.
109. Piérard GE. (2012) Cell proliferation in cutaneous malignant melanoma: relationship with neoplastic progression. ISRN Dermatol, 2012: 828146.
110. Allen AC, Spitz S. (1953) Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. Cancer, 6: 1-45.
111. Plótár V, Orosz Z, Tóth E, Szentirmay Z. (2007) A melanoma malignum hisztopatológiai prognosztikus faktorai. Magy Onkol, 51: 39-46.
112. Gimotty PA, Guerry D, Ming ME, Elenitsas R, Xu X, Czerniecki B, Spitz F, Schuchter L, Elder D. (2004) Thin primary cutaneous malignant melanoma: a

prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American Joint Committee on Cancer staging. J Clin Oncol, 22: 3668-3676.

113. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Eggermont AM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Sondak VK. (2011) Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. J Clin Oncol, 29: 2199-2205.

114. Ramsay JA, From L, Iscoe NA, Kahn HJ. (1995) MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. J Invest Dermatol, 105: 22-26.

115. Lebe B, Pabuççuoğlu U, Ozer E. (2007) The significance of Ki-67 proliferative index and cyclin D1 expression of dysplastic nevi in the biologic spectrum of melanocytic lesions. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 15: 160-164.

116. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. (2004) Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. Am J Pathol, 164: 193-203.

117. Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M, Jr. (2005) Molecular diagnostics in melanoma. J Am Acad Dermatol, 52: 743-775; quiz 775-748.

118. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. (2001) Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. J Clin Pathol, 54: 229-235.

119. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW, Scolyer RA. (2006) The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. Pathology, 38: 287-301.

120. Quatresooz P, Pierard GE, Pierard-Franchimont C. (2009) Molecular pathways supporting the proliferation staging of malignant melanoma (review). Int J Mol Med, 24: 295-301.

121. Moore MW, Gasparini R. (2011) FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. Diagn Pathol, 6: 76.

122. Vergier B, Prochazkova-Carlotti M, de la Fouchardière A, Cerroni L, Massi D, De Giorgi V, Bailly C, Wesselmann U, Karlseladze A, Avril MF, Jouary T, Merlio JP. (2011) Fluorescence in situ hybridization, a diagnostic aid in ambiguous melanocytic tumors: European study of 113 cases. Mod Pathol, 24: 613-623.

123. Zhang G, Li G. (2012) Novel multiple markers to distinguish melanoma from dysplastic nevi. PLoS One, 7: e45037.

124. A sejtproliferáció/sejtciklus/sejtosztódás szabályozása. In: Kopper L, Tímár J (szerk.), Molekuláris onkológia. Semmelweis, Budapest, 2007: 62-75.

125. A sejtciklus és szabályozása. In: Darvas Zs, László V, Sejtbiológia. Semmelweis, Budapest, 2005: 181-203.

126. Sherr CJ, Roberts JM. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev, 13: 1501-1512.

127. Sherr CJ, Roberts JM. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. Genes Dev, 18: 2699-2711.

128. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif, 36: 131-149.

129. Hégarat N, Rata S, Hochegger H. (2016) Bistability of mitotic entry and exit switches during open mitosis in mammalian cells. Bioessays, 38: 627-643.

130. Moseley JB. (2017) Wee1 and Cdc25: Tools, pathways, mechanisms, questions. Cell Cycle, 16: 599-600.

131. Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. Nature, 448: 811-815.

132. Joukov V, De Nicolo A. (2018) Aurora-PLK1 cascades as key signaling modules in the regulation of mitosis. Sci Signal, 11: eaar4195.

133. Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, Lombard A, Lumapat PN, Rogister B. (2018) The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. Cell Div, 13: 7.

134. Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. (2005) Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. J Pathol, 205: 123-129.
135. Nitiss JL. (2009) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nat Rev Cancer, 9: 327-337.
136. Bubán T, Tóth L, Tanyi M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. (2009) Ki-67 -- egy régi játékos új arcai. Orv Hetil, 150: 1059-1070.
137. Endl E, Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. Exp Cell Res, 257: 231-237.
138. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. (2019) Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. Clin Chim Acta, 491: 39-45.
139. Teleki I. (2015) Connexinek és sejtkommunikációs csatornák szerepe az emlőrák progressziójában és prognózisában. Doktori értekezés. Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem, Budapest
140. Krenács T. (2015) Connexinek és sejtkommunikációs csatornáik tanulmányozása csontvelőben, nyirokszervekben, szövetregenerációban és daganatokban. MTA doktora pályázat. MTA, Budapest
141. Meşe G, Richard G, White TW. (2007) Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol, 127: 2516-2524.
142. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. Physiol Rev, 83: 1359-1400.
143. Söhl G, Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res, 62: 228-232.
144. Goodenough DA, Paul DL. (2009) Gap junctions. Cold Spring Harb Perspect Biol, 1: a002576.
145. Desplantez T. (2017) Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. BMC Cell Biol, 18: 3.
146. Kumar NM, Gilula NB. (1996) The gap junction communication channel. Cell, 84: 381-388.

147. Decrock E, Hoorelbeke D, Ramadan R, Delvaeye T, De Bock M, Wang N, Krysko DV, Baatout S, Bultynck G, Aerts A, Vinken M, Leybaert L. (2017) Calcium, oxidative stress and connexin channels, a harmonious orchestra directing the response to radiotherapy treatment? Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 1864: 1099-1120.
148. Gleisner MA, Navarrete M, Hofmann F, Salazar-Onfray F, Tittarelli A. (2017) Mind the Gaps in Tumor Immunity: Impact of Connexin-Mediated Intercellular Connections. Front Immunol, 8: 1067.
149. Hille B. (1978) Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. Biophys J, 22: 283-294.
150. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. (2012) Gap junctions. Compr Physiol, 2: 1981-2035.
151. Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. (1998) Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. Circ Res, 83: 629-635.
152. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. (2005) Regulation of connexin expression. Biochim Biophys Acta, 1719: 6-23.
153. Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. (2013) Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. Biochim Biophys Acta, 1828: 118-133.
154. Lauf U, Giepmans BN, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM. (2002) Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 10446-10451.
155. Defamie N, Mesnil M. (2012) The modulation of gap-junctional intercellular communication by lipid rafts. Biochim Biophys Acta, 1818: 1866-1869.
156. Jordan K, Chodock R, Hand AR, Laird DW. (2001) The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. J Cell Sci, 114: 763-773.
157. Kjenseth A, Fykerud T, Rivedal E, Leithe E. (2010) Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system. Cell Signal, 22: 1267-1273.
158. Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Valette A, Tilloy A, Chevalier S, Segretain D, Pointis G. (2008) Accelerated internalization of junctional membrane proteins

(connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: an early event of DDT carcinogenicity. Biochim Biophys Acta, 1778: 56-67.

159. Leithe E, Rivedal E. (2004) Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. J Biol Chem, 279: 50089-50096.

160. Leithe E, Rivedal E. (2004) Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin43. J Cell Sci, 117: 1211-1220.

161. Boassa D, Solan JL, Papas A, Thornton P, Lampe PD, Sosinsky GE. (2010) Trafficking and recycling of the connexin43 gap junction protein during mitosis. Traffic, 11: 1471-1486.

162. Gilleron J, Carette D, Fiorini C, Dompierre J, Macia E, Denizot JP, Segretain D, Pointis G. (2011) The large GTPase dynamin2: a new player in connexin 43 gap junction endocytosis, recycling and degradation. Int J Biochem Cell Biol, 43: 1208-1217.

163. Oshima A. (2014) Structure and closure of connexin gap junction channels. FEBS Lett, 588: 1230-1237.

164. Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD. (2002) Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. J Biol Chem, 277: 36725-36730.

165. Beblo DA, Veenstra RD. (1997) Monovalent cation permeation through the connexin40 gap junction channel. Cs, Rb, K, Na, Li, TEA, TMA, TBA, and effects of anions Br, Cl, F, acetate, aspartate, glutamate, and NO3. J Gen Physiol, 109: 509-522.

166. Suchyna TM, Nitsche JM, Chilton M, Harris AL, Veenstra RD, Nicholson BJ. (1999) Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. Biophys J, 77: 2968-2987.

167. Wang HZ, Veenstra RD. (1997) Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. J Gen Physiol, 109: 491-507.

168. Hirst-Jensen BJ, Sahoo P, Kieken F, Delmar M, Sorgen PL. (2007) Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein

connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. J Biol Chem, 282: 5801-5813.

169. Verselis VK, Ginter CS, Bargiello TA. (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. Nature, 368: 348-351.

170. González D, Gómez-Hernández JM, Barrio LC. (2007) Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. Prog Biophys Mol Biol, 94: 66-106.

171. Müller DJ, Hand GM, Engel A, Sosinsky GE. (2002) Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions. Embo j, 21: 3598-3607.

172. Peracchia C. (2004) Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. Biochim Biophys Acta, 1662: 61-80.

173. Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF. (2001) v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. J Cell Biol, 154: 815-827.

174. Solan JL, Lampe PD. (2014) Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. FEBS Lett, 588: 1423-1429.

175. Laird DW. (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. Biochim Biophys Acta, 1711: 172-182.

176. Johnstone SR, Billaud M, Lohman AW, Taddeo EP, Isakson BE. (2012) Posttranslational modifications in connexins and pannexins. J Membr Biol, 245: 319-332.

177. Straub AC, Billaud M, Johnstone SR, Best AK, Yemen S, Dwyer ST, Looft-Wilson R, Lysiak JJ, Gaston B, Palmer L, Isakson BE. (2011) Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 31: 399-407.

178. Locke D, Koreen IV, Harris AL. (2006) Isoelectric points and post-translational modifications of connexin26 and connexin32. Faseb j, 20: 1221-1223.

179. Goodenough DA, Paul DL. (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. Nat Rev Mol Cell Biol, 4: 285-294.

180. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. J Neurosci, 19: 520-528.

181. Jørgensen NR, Henriksen Z, Sørensen OH, Eriksen EF, Civitelli R, Steinberg TH. (2002) Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. J Biol Chem, 277: 7574-7580.
182. Van Campenhout R, Gomes AR, De Groof TWM, Muyldermans S, Devoogdt N, Vinken M. (2021) Mechanisms Underlying Connexin Hemichannel Activation in Disease. Int J Mol Sci, 22: 3503.
183. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. (2009) Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. Cell Commun Signal, 7: 4.
184. Matsuuchi L, Naus CC. (2013) Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. Biochim Biophys Acta, 1828: 94-108.
185. Aasen T, Leithe E, Graham SV, Kameritsch P, Mayán MD, Mesnil M, Pogoda K, Tabernero A. (2019) Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. Oncogene, 38: 4429-4451.
186. Laird DW. (2010) The gap junction proteome and its relationship to disease. Trends Cell Biol, 20: 92-101.
187. Hervé JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, Giepmans BN, Bourmeyster N. (2012) Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. Biochim Biophys Acta, 1818: 1844-1865.
188. Laird DW. (2006) Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J, 394: 527-543.
189. Zhou JZ, Jiang JX. (2014) Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions--an update. FEBS Lett, 588: 1186-1192.
190. Kotini M, Barriga EH, Leslie J, Gentzel M, Rauschenberger V, Schambony A, Mayor R. (2018) Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. Nat Commun, 9: 3846.
191. Gadicherla AK, Wang N, Bulic M, Agullo-Pascual E, Lissoni A, De Smet M, Delmar M, Bultynck G, Krysko DV, Camara A, Schlüter KD, Schulz R, Kwok WM, Leybaert L. (2017) Mitochondrial Cx43 hemichannels contribute to mitochondrial calcium entry and cell death in the heart. Basic Res Cardiol, 112: 27.

192. Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Agullo E, Stahlhofen S, Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, Jorge I, Torre I, Vazquez J, Boengler K, Schulz R, Heusch G, Garcia-Dorado D. (2009) Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. Cardiovasc Res, 83: 747-756.
193. Mulkearns-Hubert EE, Reizes O, Lathia JD. (2020) Connexins in Cancer: Jekyll or Hyde? Biomolecules, 10: 1654.
194. Kelly JJ, Simek J, Laird DW. (2015) Mechanisms linking connexin mutations to human diseases. Cell Tissue Res, 360: 701-721.
195. Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR. (2011) Mutations in connexin genes and disease. Eur J Clin Invest, 41: 103-116.
196. Srinivas M, Verselis VK, White TW. (2018) Human diseases associated with connexin mutations. Biochim Biophys Acta Biomembr, 1860: 192-201.
197. McLachlan E, Plante I, Shao Q, Tong D, Kidder GM, Bernier SM, Laird DW. (2008) ODDD-linked Cx43 mutants reduce endogenous Cx43 expression and function in osteoblasts and inhibit late stage differentiation. J Bone Miner Res, 23: 928-938.
198. Scott CA, Tattersall D, O'Toole EA, Kelsell DP. (2012) Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. Biochim Biophys Acta, 1818: 1952-1961.
199. Avshalumova L, Fabrikant J, Koriakos A. (2014) Overview of skin diseases linked to connexin gene mutations. Int J Dermatol, 53: 192-205.
200. Cisterna BA, Arroyo P, Puebla C. (2019) Role of Connexin-Based Gap Junction Channels in Communication of Myelin Sheath in Schwann Cells. Front Cell Neurosci, 13: 69.
201. Rash JE, Vanderpool KG, Yasumura T, Hickman J, Beatty JT, Nagy JI. (2016) KV1 channels identified in rodent myelinated axons, linked to Cx29 in innermost myelin: support for electrically active myelin in mammalian saltatory conduction. J Neurophysiol, 115: 1836-1859.
202. Castorena-Gonzalez JA, Zawieja SD, Li M, Srinivasan RS, Simon AM, de Wit C, de la Torre R, Martinez-Lemus LA, Hennig GW, Davis MJ. (2018) Mechanisms of Connexin-Related Lymphedema. Circ Res, 123: 964-985.

203. García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M. (2004) Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. Cardiovasc Res, 61: 386-401.

204. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. (1996) Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 1831-1835.

205. Moolten FL, Wells JM. (1990) Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. J Natl Cancer Inst, 82: 297-300.

206. Loewenstein WR, Kanno Y. (1966) Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. Nature, 209: 1248-1249.

207. Trosko JE, Ruch RJ. (1998) Cell-cell communication in carcinogenesis. Front Biosci, 3: d208-236.

208. Yotti LP, Chang CC, Trosko JE. (1979) Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. Science, 206: 1089-1091.

209. Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, Mackowiak, II, Mori CM, da Silva TC, Oloris SC, Gárate AP, Massironi SM, Yamasaki H, Dagli ML. (2004) Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. Carcinogenesis, 25: 1973-1982.

210. Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M. (2009) Gap junctions and cancer: new functions for an old story. Antioxid Redox Signal, 11: 323-338.

211. Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. (1997) High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. Curr Biol, 7: 713-716.

212. Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ. (2000) Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1)after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. J Cell Biochem, 79: 347-354.

213. Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. (2001) Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. Oncogene, 20: 4138-4149.

214. Leithe E. (2016) Regulation of connexins by the ubiquitin system: Implications for intercellular communication and cancer. Biochim Biophys Acta, 1865: 133-146.

215. Stoletov K, Strnadel J, Zardouzian E, Momiyama M, Park FD, Kelber JA, Pizzo DP, Hoffman R, VandenBerg SR, Klemke RL. (2013) Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. J Cell Sci, 126: 904-913.

216. Zhang W, Nwagwu C, Le DM, Yong VW, Song H, Couldwell WT. (2003) Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. J Neurosurg, 99: 1039-1046.

217. Kapoor P, Saunders MM, Li Z, Zhou Z, Sheaffer N, Kunze EL, Samant RS, Welch DR, Donahue HJ. (2004) Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. Int J Cancer, 111: 693-697.

218. Tang B, Peng ZH, Yu PW, Yu G, Qian F, Zeng DZ, Zhao YL, Shi Y, Hao YX, Luo HX. (2013) Aberrant expression of Cx43 is associated with the peritoneal metastasis of gastric cancer and Cx43-mediated gap junction enhances gastric cancer cell diapedesis from peritoneal mesothelium. PLoS One, 8: e74527.

219. Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Er EE, Lopez-Soto A, Jacob L, Patwa R, Shah H, Xu K, Cross JR, Massagué J. (2016) Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. Nature, 533: 493-498.

220. Lin Q, Balasubramanian K, Fan D, Kim SJ, Guo L, Wang H, Bar-Eli M, Aldape KD, Fidler IJ. (2010) Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels. Neoplasia, 12: 748-754.

221. Menachem A, Makovski V, Bodner O, Pasmanik-Chor M, Stein R, Shomron N, Kloog Y. (2016) Intercellular transfer of small RNAs from astrocytes to lung tumor cells induces resistance to chemotherapy. Oncotarget, 7: 12489-12504.

222. Crespin S, Bechberger J, Mesnil M, Naus CC, Sin WC. (2010) The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. J Cell Biochem, 110: 589-597.

223. Hong X, Sin WC, Harris AL, Naus CC. (2015) Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA. Oncotarget, 6: 15566-15577.

224. Balla P, Maros ME, Barna G, Antal I, Papp G, Sapi Z, Athanasou NA, Benassi MS, Picci P, Krenacs T. (2015) Prognostic impact of reduced connexin43 expression and gap junction coupling of neoplastic stromal cells in giant cell tumor of bone. PLoS One, 10: e0125316.

225. Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z. (2013) The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. BMC Cancer, 13: 50.

226. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T. (2014) Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. PLoS One, 9: e112541.

227. Gurbi B, Brauswetter D, Varga A, Gyulavári P, Pénzes K, Murányi J, Zámbó V, Birtalan E, Krenács T, Becker DL, Csala M, Vályi-Nagy I, Peták I, Dános K. (2019) The Potential Impact of Connexin 43 Expression on Bcl-2 Protein Level and Taxane Sensitivity in Head and Neck Cancers-In Vitro Studies. Cancers (Basel), 11: 1848.

228. Dános K, Brauswetter D, Birtalan E, Pató A, Bencsik G, Krenács T, Peták I, Tamás L. (2016) The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 24: 476-481.

229. Ableser MJ, Penuela S, Lee J, Shao Q, Laird DW. (2014) Connexin43 reduces melanoma growth within a keratinocyte microenvironment and during tumorigenesis in vivo. J Biol Chem, 289: 1592-1603.

230. Haass NK, Ripperger D, Wladykowski E, Dawson P, Gimotty PA, Blome C, Fischer F, Schmage P, Moll I, Brandner JM. (2010) Melanoma progression exhibits a significant impact on connexin expression patterns in the epidermal tumor microenvironment. Histochem Cell Biol, 133: 113-124.

231. Haass NK, Wladykowski E, Kief S, Moll I, Brandner JM. (2006) Differential induction of connexins 26 and 30 in skin tumors and their adjacent epidermis. J Histochem Cytochem, 54: 171-182.

232. Rezze GG, Fregnani JH, Duprat J, Landman G. (2011) Cell adhesion and communication proteins are differentially expressed in melanoma progression model. Hum Pathol, 42: 409-418.

233. Villares GJ, Dobroff AS, Wang H, Zigler M, Melnikova VO, Huang L, Bar-Eli M. (2009) Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43. Cancer Res, 69: 6730-6737.

234. Tittarelli A, Guerrero I, Tempio F, Gleisner MA, Avalos I, Sabanegh S, Ortíz C, Michea L, López MN, Mendoza-Naranjo A, Salazar-Onfray F. (2015) Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. Br J Cancer, 113: 259-267.

235. Masuda M, Usami S, Yamazaki K, Takumi Y, Shinkawa H, Kurashima K, Kunihiro T, Kanzaki J. (2001) Connexin 26 distribution in gap junctions between melanocytes in the human vestibular dark cell area. Anat Rec, 262: 137-146.

236. Saito-Katsuragi M, Asada H, Niizeki H, Katoh F, Masuzawa M, Tsutsumi M, Kuniyasu H, Ito A, Nojima H, Miyagawa S. (2007) Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. Cancer, 110: 1162-1172.

237. Teixeira TF, Gentile LB, da Silva TC, Mennecier G, Chaible LM, Cogliati B, Roman MA, Gioso MA, Dagli ML. (2014) Cell proliferation and expression of connexins differ in melanotic and amelanotic canine oral melanomas. Vet Res Commun, 38: 29-38.

238. Watanabe M, Iwashita M, Ishii M, Kurachi Y, Kawakami A, Kondo S, Okada N. (2006) Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. EMBO Rep, 7: 893-897.

239. Watanabe M, Kondo S. (2012) Changing clothes easily: connexin41.8 regulates skin pattern variation. Pigment Cell Melanoma Res, 25: 326-330.

240. Li J, Habbes HW, Eiberger J, Willecke K, Dermietzel R, Meier C. (2007) Analysis of connexin expression during mouse Schwann cell development identifies

connexin29 as a novel marker for the transition of neural crest to precursor cells. Glia, 55: 93-103.

241. Kiszner G, Balla P, Wichmann B, Barna G, Baghy K, Nemeth IB, Varga E, Furi I, Toth B, Krenacs T. (2019) Exploring Differential Connexin Expression across Melanocytic Tumor Progression Involving the Tumor Microenvironment. Cancers (Basel), 11: 165.

242. Wu JI, Wang LH. (2019) Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. J Biomed Sci, 26: 8.

243. Aucher A, Rudnicka D, Davis DM. (2013) MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation. J Immunol, 191: 6250-6260.

244. Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Taborga M, Dave MA, Gregory LA, Greco SJ, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P. (2011) Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. Cancer Res, 71: 1550-1560.

245. Epifantseva I, Xiao S, Baum RE, Kléber AG, Hong T, Shaw RM. (2020) An Alternatively Translated Connexin 43 Isoform, GJA1-11k, Localizes to the Nucleus and Can Inhibit Cell Cycle Progression. Biomolecules, 10: 473.

246. González-Sánchez A, Jaraíz-Rodríguez M, Domínguez-Prieto M, Herrero-González S, Medina JM, Tabernero A. (2016) Connexin43 recruits PTEN and Csk to inhibit c-Src activity in glioma cells and astrocytes. Oncotarget, 7: 49819-49833.

247. Fujimoto E, Satoh H, Negishi E, Ueno K, Nagashima Y, Hagiwara K, Yamasaki H, Yano T. (2004) Negative growth control of renal cell carcinoma cell by connexin 32: possible involvement of Her-2. Mol Carcinog, 40: 135-142.

248. Zhao B, Zhao W, Wang Y, Xu Y, Xu J, Tang K, Zhang S, Yin Z, Wu Q, Wang X. (2015) Connexin32 regulates hepatoma cell metastasis and proliferation via the p53 and Akt pathways. Oncotarget, 6: 10116-10133.

249. Xiang Y, Wang Q, Guo Y, Ge H, Fu Y, Wang X, Tao L. (2019) Cx32 exerts anti-apoptotic and pro-tumor effects via the epidermal growth factor receptor pathway in hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res, 38: 145.

250. Lin YP, Wu JI, Tseng CW, Chen HJ, Wang LH. (2019) Gjb4 serves as a novel biomarker for lung cancer and promotes metastasis and chemoresistance via Src activation. Oncogene, 38: 822-837.

251. Li Q, Omori Y, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yamamoto Y, Enomoto K. (2007) Cytoplasmic accumulation of connexin32 protein enhances motility and metastatic ability of human hepatoma cells in vitro and in vivo. Int J Cancer, 121: 536-546.

252. Yang J, Qin G, Luo M, Chen J, Zhang Q, Li L, Pan L, Qin S. (2015) Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT. Cell Death Dis, 6: e1829.

253. Liu Z, Xu D, Wang S, Chen Y, Li Z, Gao X, Jiang L, Tang Y, Peng Y. (2017) Astrocytes induce proliferation of oligodendrocyte progenitor cells via connexin 47-mediated activation of the ERK/Id4 pathway. Cell Cycle, 16: 714-722.

254. Fostok SF, El-Sibai M, El-Sabban M, Talhouk RS. (2019) Gap Junctions and Wnt Signaling in the Mammary Gland: a Cross-Talk? J Mammary Gland Biol Neoplasia, 24: 17-38.

255. Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI. (2000) Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. J Clin Invest, 105: 161-171.

256. Kamei J, Toyofuku T, Hori M. (2003) Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun, 312: 380-387.

257. Sirnes S, Bruun J, Kolberg M, Kjenseth A, Lind GE, Svindland A, Brech A, Nesbakken A, Lothe RA, Leithe E, Rivedal E. (2012) Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. Int J Cancer, 131: 570-581.

258. Banerjee D. (2016) Connexin's Connection in Breast Cancer Growth and Progression. Int J Cell Biol, 2016: 9025905.

259. Talhouk RS, Fares MB, Rahme GJ, Hariri HH, Rayess T, Dbouk HA, Bazzoun D, Al-Labban D, El-Sabban ME. (2013) Context dependent reversion of tumor phenotype by connexin-43 expression in MDA-MB231 cells and MCF-7 cells: role of β-catenin/connexin43 association. Exp Cell Res, 319: 3065-3080.

260. Herrero-González S, Gangoso E, Giaume C, Naus CC, Medina JM, Tabernero A. (2010) Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. Oncogene, 29: 5712-5723.

261. Shi Q, Gu S, Yu XS, White TW, Banks EA, Jiang JX. (2015) Connexin Controls Cell-Cycle Exit and Cell Differentiation by Directly Promoting Cytosolic Localization and Degradation of E3 Ligase Skp2. Dev Cell, 35: 483-496.

262. Jee H, Lee SH, Park JW, Lee BR, Nam KT, Kim DY. (2013) Connexin32 inhibits gastric carcinogenesis through cell cycle arrest and altered expression of p21Cip1 and p27Kip1. BMB Rep, 46: 25-30.

263. Chen R, Chen Y, Yuan Y, Zou X, Sun Q, Lin H, Chen X, Liu M, Deng Z, Yao Y, Guo D, Zhang Y. (2020) Cx43 and AKAP95 regulate G1/S conversion by competitively binding to cyclin E1/E2 in lung cancer cells. Thorac Cancer, 11: 1594-1602.

264. Hino H, Dai P, Yoshida T, Hatakeyama T, Harada Y, Otsuji E, Okuda T, Takamatsu T. (2015) Interaction of Cx43 with Hsc70 regulates G1/S transition through CDK inhibitor p27. Sci Rep, 5: 15365.

265. Zhang D, Chen C, Li Y, Fu X, Xie Y, Li Y, Huang Y. (2012) Cx31.1 acts as a tumour suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines through inhibition of cell proliferation and metastasis. J Cell Mol Med, 16: 1047-1059.

266. Johnstone SR, Kroncke BM, Straub AC, Best AK, Dunn CA, Mitchell LA, Peskova Y, Nakamoto RK, Koval M, Lo CW, Lampe PD, Columbus L, Isakson BE. (2012) MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation. Circ Res, 111: 201-211.

267. Bazzoun D, Adissu HA, Wang L, Urazaev A, Tenvooren I, Fostok SF, Chittiboyina S, Sturgis J, Hodges K, Chandramouly G, Vidi PA, Talhouk RS, Lelièvre SA. (2019) Connexin 43 maintains tissue polarity and regulates mitotic spindle orientation in the breast epithelium. J Cell Sci, 132.

268. Chandrasekhar A, Kalmykov EA, Polusani SR, Mathis SA, Zucker SN, Nicholson BJ. (2013) Intercellular redistribution of cAMP underlies selective suppression of cancer cell growth by connexin26. PLoS One, 8: e82335.

269. Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE. (1980) Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, 77: 5258-5262.

270. Nagy D, Kosztka L, Pap P, Nagy Z, Rusznák Z, Csernoch L, Szücs G. (2011) Cytoplasmic Ca2+ concentration changes evoked by muscarinic cholinergic stimulation in primary and metastatic melanoma cell lines. Melanoma Res, 21: 12-23.

271. Darvas Z, Sakurai E, Schwelberger HG, Hegyesi H, Rivera E, Othsu H, Watanabe T, Pállinger E, Falus A. (2003) Autonomous histamine metabolism in human melanoma cells. Melanoma Res, 13: 239-246.

272. Dasgupta P, Linnenbach AJ, Giaccia AJ, Stamato TD, Reddy EP. (1989) Molecular cloning of the breakpoint region on chromosome 6 in cutaneous malignant melanoma: evidence for deletion in the c-myb locus and translocation of a segment of chromosome 12. Oncogene, 4: 1201-1205.

273. Kormos B, Belso N, Bebes A, Szabad G, Bacsa S, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgo Z. (2011) In vitro dedifferentiation of melanocytes from adult epidermis. PLoS One, 6: e17197.

274. Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E. (2012) Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. Histochem Cell Biol, 138: 653-667.

275. Szabad G, Kormos B, Pivarcsi A, Széll M, Kis K, Kenderessy Szabó A, Dobozy A, Kemény L, Bata-Csörgo Z. (2007) Human adult epidermal melanocytes cultured without chemical mitogens express the EGF receptor and respond to EGF. Arch Dermatol Res, 299: 191-200.

276. Talantov D, Mazumder A, Yu JX, Briggs T, Jiang Y, Backus J, Atkins D, Wang Y. (2005) Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. Clin Cancer Res, 11: 7234-7242.

277. Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, Liu S, Ren S, Morris C, Xi Y, Howell P, Metge B, Samant RS, Shevde LA, Li W, Eschrich S, Daud A, Ju J, Matta J. (2008) The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. BMC Med Genomics, 1: 13.

278. Xu L, Shen SS, Hoshida Y, Subramanian A, Ross K, Brunet JP, Wagner SN, Ramaswamy S, Mesirov JP, Hynes RO. (2008) Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases. Mol Cancer Res, 6: 760-769.

279. Hussein MR, Sun M, Tuthill RJ, Roggero E, Monti JA, Sudilovsky EC, Wood GS, Sudilovsky O. (2001) Comprehensive analysis of 112 melanocytic skin lesions demonstrates microsatellite instability in melanomas and dysplastic nevi, but not in benign nevi. J Cutan Pathol, 28: 343-350.

280. Sekulic A, Haluska P, Jr., Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, Salomao DR, Thorland EC, Vile RG, Swanson DL, Pockaj BA, Laman SD, Pittelkow MR, Markovic SN. (2008) Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc, 83: 825-846.

281. van den Hurk K, Niessen HE, Veeck J, van den Oord JJ, van Steensel MA, Zur Hausen A, van Engeland M, Winnepenninckx VJ. (2012) Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. Biochim Biophys Acta, 1826: 89-102.

282. Kuźbicki L, Aładowicz E, Chwirot BW. (2006) Cyclin-dependent kinase 2 expression in human melanomas and benign melanocytic skin lesions. Melanoma Res, 16: 435-444.

283. Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis GJ, Furgał-Borzych A, Surówka G, Litwin JA. (2010) Cyclin D1 and D3 expression in melanocytic skin lesions. Arch Dermatol Res, 302: 545-550.

284. de Sá BC, Fugimori ML, Ribeiro Kde C, Duprat Neto JP, Neves RI, Landman G. (2009) Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas. Melanoma Res, 19: 135-141.

285. Karim RZ, Li W, Sanki A, Colman MH, Yang YH, Thompson JF, Scolyer RA. (2009) Reduced p16 and increased cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. Int J Surg Pathol, 17: 361-367.

286. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. (2005) Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. Ann Diagn Pathol, 9: 185-188.

287. Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis GJ, Wiśniowski Z, Czerwińska M, Niewiara Ł, Litwin JA. (2012) Expression of cyclins A and E in melanocytic skin lesions and

its correlation with some clinicopathologic features. Folia Histochem Cytobiol, 50: 263-269.

288. Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, Schwahn DJ, Xu W, Didenko V, Leiss P, Conrad N, Pereira-Smith O, Orengo I, Medrano EE. (1999) High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. J Invest Dermatol, 113: 1039-1046.

289. Flørenes VA, Maelandsmo GM, Faye R, Nesland JM, Holm R. (2001) Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. J Pathol, 195: 530-536.

290. Tran TA, Ross JS, Carlson JA, Mihm MC, Jr. (1998) Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. Hum Pathol, 29: 1085-1090.

291. Stefanaki C, Stefanaki K, Antoniou C, Argyrakos T, Patereli A, Stratigos A, Katsambas A. (2007) Cell cycle and apoptosis regulators in Spitz nevi: comparison with melanomas and common nevi. J Am Acad Dermatol, 56: 815-824.

292. Boyd AS, Shakhtour B, Shyr Y. (2008) Minichromosome maintenance protein expression in benign nevi, dysplastic nevi, melanoma, and cutaneous melanoma metastases. J Am Acad Dermatol, 58: 750-754.

293. de Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. (2013) Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma. Ann Diagn Pathol, 17: 32-36.

294. Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S, Bechara FG, Stücker M, Altmeyer P, Kreuter A. (2009) Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions. J Am Acad Dermatol, 60: 808-813.

295. Lynch BJ, Komaromy-Hiller G, Bronstein IB, Holden JA. (1998) Expression of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II-alpha, and p53 in metastatic malignant melanoma. Hum Pathol, 29: 1240-1245.

296. Mu XC, Tran TA, Ross JS, Carlson JA. (2000) Topoisomerase II-alpha expression in melanocytic nevi and malignant melanoma. J Cutan Pathol, 27: 242-248.

297. Wang X, Moschos SJ, Becker D. (2010) Functional analysis and molecular targeting of aurora kinases a and B in advanced melanoma. Genes Cancer, 1: 952-963.

298. Bergman R, Malkin L, Sabo E, Kerner H. (2001) MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. J Am Acad Dermatol, 44: 500-504.

299. Chorny JA, Barr RJ, Kyshtoobayeva A, Jakowatz J, Reed RJ. (2003) Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevomelanocytic lesions. Mod Pathol, 16: 525-529.

300. Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, Sueper RH, Swanson PE, Ritter JH, Wick MR. (2000) Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? Mod Pathol, 13: 217-222.

301. Kapur P, Selim MA, Roy LC, Yegappan M, Weinberg AG, Hoang MP. (2005) Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. Mod Pathol, 18: 197-204.

302. Scatolini M, Grand MM, Grosso E, Venesio T, Pisacane A, Balsamo A, Sirovich R, Risio M, Chiorino G. (2010) Altered molecular pathways in melanocytic lesions. Int J Cancer, 126: 1869-1881.

303. Loddo M, Kingsbury SR, Rashid M, Proctor I, Holt C, Young J, El-Sheikh S, Falzon M, Eward KL, Prevost T, Sainsbury R, Stoeber K, Williams GH. (2009) Cell-cycle-phase progression analysis identifies unique phenotypes of major prognostic and predictive significance in breast cancer. Br J Cancer, 100: 959-970.

304. Krenacs T, Ficsor L, Varga SV, Angeli V, Molnar B. (2010) Digital microscopy for boosting database integration and analysis in TMA studies. Methods Mol Biol, 664: 163-175.

305. Lei M. (2005) The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets, 5: 365-380.

306. Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákosy Z, Orosz A, Lázár V, Emri G, Koroknai V, Kiss T, Ádány R, Balázs M. (2012) The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. Tumour Biol, 33: 2189-2199.
307. Natsuga K, Watanabe M, Nishie W, Shimizu H. (2019) Life before and beyond blistering: The role of collagen XVII in epidermal physiology. Exp Dermatol, 28: 1135-1141.
308. Sáez JC, Leybaert L. (2014) Hunting for connexin hemichannels. FEBS Lett, 588: 1205-1211.
309. Grzywa TM, Paskal W, Włodarski PK. (2017) Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. Transl Oncol, 10: 956-975.
310. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, McCubrey JA, Candido S, Libra M. (2018) Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). Int J Oncol, 52: 1071-1080.
311. Zucker SN, Bancroft TA, Place DE, Des Soye B, Bagati A, Berezney R. (2013) A dominant negative Cx43 mutant differentially affects tumorigenic and invasive properties in human metastatic melanoma cells. J Cell Physiol, 228: 853-859.
312. Makhzami S, Rambow F, Delmas V, Larue L. (2012) Efficient gene expression profiling of laser-microdissected melanoma metastases. Pigment Cell Melanoma Res, 25: 783-791.
313. Martin PE, van Steensel M. (2015) Connexins and skin disease: insights into the role of beta connexins in skin homeostasis. Cell Tissue Res, 360: 645-658.
314. Villanueva J, Herlyn M. (2008) Melanoma and the tumor microenvironment. Curr Oncol Rep, 10: 439-446.
315. Goldstein AM, Tucker MA. (2013) Dysplastic nevi and melanoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 22: 528-532.
316. Varela-Vázquez A, Guitián-Caamaño A, Carpintero-Fernandez P, Fonseca E, Sayedyahossein S, Aasen T, Penuela S, Mayán MD. (2020) Emerging functions and clinical prospects of connexins and pannexins in melanoma. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 1874: 188380.
317. Goovaerts G, Buyssens N. (1988) Nevus cell maturation or atrophy? Am J Dermatopathol, 10: 20-27.

318. Alaga KC, Crawford M, Dagnino L, Laird DW. (2017) Aberrant Cx43 Expression and Mislocalization in Metastatic Human Melanomas. J Cancer, 8: 1123-1128.

319. Boucher J, Monvoisin A, Vix J, Mesnil M, Thuringer D, Debiais F, Cronier L. (2018) Connexins, important players in the dissemination of prostate cancer cells. Biochim Biophys Acta Biomembr, 1860: 202-215.

320. Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi AB. (2008) Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. BMC Med, 6: 20.

321. Zibara K, Awada Z, Dib L, El-Saghir J, Al-Ghadban S, Ibrik A, El-Zein N, El-Sabban M. (2015) Anti-angiogenesis therapy and gap junction inhibition reduce MDA-MB-231 breast cancer cell invasion and metastasis in vitro and in vivo. Sci Rep, 5: 12598.

322. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. (2005) Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. Pigment Cell Res, 18: 150-159.

323. Coutinho P, Qiu C, Frank S, Tamber K, Becker D. (2003) Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. Cell Biol Int, 27: 525-541.

324. Montgomery J, Ghatnekar GS, Grek CL, Moyer KE, Gourdie RG. (2018) Connexin 43-Based Therapeutics for Dermal Wound Healing. Int J Mol Sci, 19: 1778.

325. Wang CM, Lincoln J, Cook JE, Becker DL. (2007) Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. Diabetes, 56: 2809-2817.

11 Saját publikációk jegyzéke

11.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kiszner G**, Balla P, Wichmann B, Barna G, Baghy K, Nemeth IB, Varga E, Furi I, Toth B, Krenacs T. (2019) Exploring differential connexin expression across melanocytic tumor progression involving the tumor microenvironment. Cancers (Basel), 11: 165. **(IF = 6,126)**
2. **Kiszner G**, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, Krenacs T. (2014) Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. Virchows Arch, 464: 603-612. **(IF = 2,651)**

11.2 A disszertációtól független közlemények

1. Tőkés T, Tőkés AM, Szentmártoni G, **Kiszner G**, Mühl D, Molnár B, Kulka J, Krenács T, Dank M. (2020) Prognostic and clinicopathological correlations of cell cycle marker expressions before and after the primary systemic therapy of breast cancer. Pathol Oncol Res, 26: 1499-1510. **(IF = 3,201)**
2. Tőkés T, Tőkés AM, Szentmártoni G, **Kiszner G**, Madaras L, Kulka J, Krenács T, Dank M. (2016) Expression of cell cycle markers is predictive of the response to primary systemic therapy of locally advanced breast cancer. Virchows Arch, 468: 675-686. **(IF = 2,848)**
3. Rajnai H, Teleki I, **Kiszner G**, Meggyesházi N, Balla P, Vancsik T, Muzes G, Csomor J, Matolcsy A, Krenacs T. (2015) Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas. J Immunol Res, 2015: 528098. **(IF = 2,812)**
4. Szentkúti G, Dános K, Brauswetter D, **Kiszner G**, Krenács T, Csákó L, Répássy G, Tamás L. (2015) Correlations between prognosis and regional biomarker profiles in head and neck squamous cell carcinomas. Pathol Oncol Res, 21: 643-650. **(IF = 1,940)**
5. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, **Kiszner G**, Balla P, Samu A, Krenacs T. (2014) Correlations of differentially expressed gap

junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. PLoS One, 9: e112541. **(IF = 3,234)**

6. Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, Balla P, **Kiszner G**, Teleki I, Kovago C, Krenacs T. (2015) Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. Cell Stress Chaperones, 20: 37-46. **(IF = 2,583)**
7. Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, Balla P, **Kiszner G**, Teleki I, Jeney A, Krenacs T. (2014) DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia. Strahlenther Onkol, 190: 815-822. **(IF = 2,914)**
8. Stelkovics E, **Kiszner G**, Meggyeshazi N, Korom I, Varga E, Nemeth I, Molnar J, Marczinovits I, Krenacs T. (2013) Selective in situ protein expression profiles correlate with distinct phenotypes of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. Histol Histopathol, 28: 941-954. **(IF = 2,236)**
9. Krenacs T, **Kiszner G**, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E. (2012) Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. Histochem Cell Biol, 138: 653-667. **(IF = 2,613)**

12 Köszönetnyilvánítás

A legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, Krenács Tibornak tartozom, aki tudományos diákköri munkára magához fogadott egy szeretnivaló társaságba, ahol megtanulhattam a tudományos kutatás alapjait, módszereit, a kritikus gondolkodás fontosságát, és azt, hogy a kezdetben érdektelennek tűnő megfigyeléseknek is jelentőségük lehet. Orvosi diplomám megszerzését követően biztatott, hogy a megkezdett közös kutatásunkat a PhD-képzés keretein belül tovább folytassam, aminek eredményeit e disszertációban büszkén mutathatom be. Kiemelt köszönetemet fejezem ki Matolcsy András professzor úrnak, amiért az általa vezetett Intézetben végezhettem kutatómunkámat, és sokat támogatott szakmai előrehaladásomban. Hálával tartozom laboratóriumunk többi egykori munkatársának, Parsch Editnek†, Teleki Ivettnek, Meggyesházi Nórának, Balla Péternek, Maros Mátának és a többieknek a számtalan szakmai segítségért és tanácsért, valamint azért a pozitív környezetért, ahová örömmel járhattam be dolgozni. Hasonló hála jár a Semmelweis Egyetem I. Patológiai Intézet további dolgozóinak is, Kovalszky Ilona professzor asszonynak, Csorba Gézáné Maricának†, Baghy Kornéliának, Barna Gábornak, Hollósi Péternek, Oláh Lászlónénak, Egedi Krisztinának, Gángó Ambrusnak, Dankó Titanillának, Mátrainé Balogh Évának, Gróf Stefániának és másoknak, akik közül sokan nem csak szakmailag támogattak, de a munkahelyen kívül is barátsággal és segítőkészséggel fordultak hozzám.

A tudományos munkám során vizsgált szövettani anyagok, izolált melanocyták és a dermatopatológiai szakmai háttér biztosításáért nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a Szegedi Tudományegyetem Bőrklinikájának munkatársai: Korom Irma, Varga Erika, Németh István Balázs, Kormos Bernadett, Kohajda Mónika, Bozó Renáta, Függ Erika, Kórászné Lauf Krisztina, Papp Diána és Veszprémi Éva, ezért hálával tartozom nekik. A biostatisztikában való jártassága és sok-sok segítsége miatt köszönet illeti Wichmann Barnát. A listát nevek százával folytathatnám, hiszen hálás vagyok valamennyi munkatársamnak, akik segítségemre voltak kutatómunkám során. Köszönettel tartozom az Országos Onkológiai Intézetben dolgozó kollégáimnak a támogatásért, hogy kutatásomat a klinikai munka mellett is folytathattam. Végül, köszönetemet fejezem ki családomnak és barátaimnak a kitartásért és ösztönzésért, amik nélkül talán el sem jutottam volna ennek a disszertációnak a bemutatásáig.