Synovialis sarcoma vizsgálata *in vitro* miR-206 módosított modellrendszerben és likvid biopsziás mintákban

Doktori értekezés

Dr. Mihály Dóra

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Sápi Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Skaliczki Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szász A. Marcell, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Szőke János, Ph.D., központvezető főorvos

Budapest
2020

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4

1. BEVEZETÉS 7

1.1. Synovialis sarcoma 7

1.2. A SMARCB1 gén és szerepe a SWI/SNF kromatin-átrendező komplexben 12

1.2.1. A SMARCB1 gén nevezéktana 12

1.2.2. A SMARCB1 gén elhelyezkedése a SWI/SNF kromatin-átrendező komplexben 12

1.2.3. A SMARCB1 gén funkciói 13

1.2.4. A SMARCB1-deficiens tumorok 15

1.3. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok 16

1.3.1. Hiszton modifikáció 16

1.3.2. DNS metiláció 17

1.3.3. mikroRNS-ek (miRNS-ek) 17

1.3.3.1. A miRNS-ek keletkezése, érése 19

1.3.3.2. miRNS-ek a tumorképződésben 20

1.3.3.3. A miR-206 20

1.4. Fúziós transzkriptumok mint likvid biopsziás markerek lágyrész daganatokban 21

2. CÉLKITŰZÉSEK 23

3. MÓDSZEREK 24

3.1. Vegyszerek, oldatok, pufferek 24

3.2. Az iASC és az SS-iASC sejtvonalak létrehozása 25

3.3. A sejtkultúrák tenyésztése 25

3.4. Fluoreszcens In Situ Hibridizáció (FISH) 26

3.5.Kariotipizálás 29

3.6. Permanens miRNS transzfekció 29

3.7. A permanens miRNS expresszió gátlása miRNS inhibitor transzfekciójával 31

3.8. Nukleinsavak izolálása 31

3.9. Az SS-iASC sejtvonal hitelesítése STR analízissel 32

3.10. Reverz transzkripció (RT) 33

3.11. Valós-idejű kvantitatív PCR (q-RT-PCR) 35

3.12. SS18-SSX1 és SS18-SSX2 fúziós gének detektálása nested PCR-rel 37

3.13. Droplet Digitális PCR (ddPCR) 39

3.14. Fehérje izolálás sejtekből 42

3.15. Western blot 42

3.16. Immuncitokémia *43*

3.17. Áramlás citometria *44*

3.18. Statisztikai analízis *46*

3.19. Mintavételi szempontok a synovialis sarcomával diagnosztizált betegeknél *46*

4. EREDMÉNYEK **47**

4.1. Az SS-iASC sejtvonal vizsgálata *47*

4.1.1. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) 47

4.1.2. Az SS-iASC és iASC sejtvonalak kariotipizálása 47

4.1.3. Az SS-iASC sejtvonal STR analízise 48

4.1.4. A kimérikus SS18-SSX1gén kifejeződése mRNS és fehérje szinten 48

4.1.5. Az iASC és SS-iASC sejtek immuncitokémiai jellemzői 51

4.2. A permanens miR-206 transzfekció hatásának funkcionális vizsgálata sejttenyészetekben *52*

4.2.1. A permanens miR-206 transzfekció hatásosságának ellenőrzése és a miR-206 expresszió relatív szintjének meghatározása 52

4.2.2. A miR-206 célgének relatív expressziója és azok változása az inhibíciót követően 53

4.2.3. A SMARCB1 fehérje expresszió változása permanens miR-206 transzfekciót követően 57

4.3. Az SS18-SSX fúziós transzkriptum, mint biomarker synoviális sarcomás betegek likvid biopsziás mintáiban *59*

4.3.1. A klinikai adatok áttekintése 59

4.3.2. A nested PCR és droplet digitális PCR eredményei 60

5.MEGBESZÉLÉS **64**

6.KÖVETKEZTETÉSEK **71**

7. ÖSSZEFOGLALÁS **72**

8. SUMMARY **73**

9. IRODALOMJEGYZÉK **74**

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE **88**

10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények *88*

10.2. Egyéb témában megjelent közlemények *88*

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **89**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC: egyedi szekvencia azonosítószám („accession number”)

ASC: zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejtek („adipose tissue-derived mesenchymal stem cells”)

BAF: „Brahma gene (BRM) or Brg1-associated factors”

Bcl2: „B-cell lymphoma 2” fehérje

bFGF: alap fibroblast növekedési faktor („fibroblast growth factor-basic”)

BSA: marha szérum-albumin („bovine serum albumin”)

CD117: „Stem cell growth factor receptor” vagy „cluster of differentiation 117”

cDNS: komplementer DNS

CMV: cytomegalovírus

DAB: 3-3’ diamino-benzidin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

ddPCR: droplet digitális polimeráz láncreakció

DMEM-F12: „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/Ham’s Nutrient Mixture F12”

DNS: dezoxiribonukleinsav

dNTP: dezoxiribonukleotid-trifoszfát

DSMZ: Német Mikroorganizmus és Sejtkultúra Gyűjtemény („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”)

EMA: epithelialis membrán antigén („epithelial membrane antigen”)

EMPNST: epithelioid malignus perifériás ideghüvely tumor

ES: epithelioid sarcoma

EZH2: „Enhancer of zeste homolog 2”

FAM: fluoreszcein amidit

FBS: foetalis borjú szérum („fetal bovine serum”)

FFPE: formalin-fixált, paraffinba ágyazott („formalin-fixed paraffin embedded”)

GFP: zöld fluoreszcens fehérje („green fluorescent protein”)

H3K27 Me3: H3-as hiszton 27-es lizinjének trimetilációja

HRP: tormaperoxidáz („horseradish peroxidase”)

iASC: immortalizált ASC („immortalized ASC”)

H_2O_2: hidrogén-peroxid

HA: haemagglutinin

HIV: humán immundeficiencia vírus

HMGA2: „High Mobility Group AT-hook 2”

HT-1080: „human epithelioid fibrosarcoma cells”

HUGO: „Human Genome Organisation”

INI1: „Integrase Interactor 1”

miRNA: „micro RNA”

miRNS: mikroRNS

MRB: mérhető reziduális betegség

mRNS: messenger RNS

MRT: malignus rhabdoid tumor

PBAF: „Polybromo Brahma gene (BRM) or Brg1-associated factors”

pCMV6-MIR: CMV promóterrel ellátott miRNS prekurzor kifejezésére alkalmas vektor

PCR: polimeráz láncreakció

PRC2: „Polycomb repressor complex 2”

pri-miRNS: primer miRNS

PVDF: polivinilidén-fluorid

q-RT-PCR: kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció

RNS: ribonukleinsav

SCID: súlyos kombinált immundefektus („severe combined immunodeficiency”)

SMARCB1: „SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily b, member1”

SNF5: „Sucrose non-fermenting 5”

SS-iASC: SS18-SSX1 fúziós gént kifejező immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejt („SS18-SSX1 carrying immortalized ASCs”)

STR: rövid tandem ismétlődő szekvencia („short tandem repeat”)

TLE1: „Transducin-like enhancer of split 1”

1. BEVEZETÉS

1.1. Synovialis sarcoma

A synovialis sarcomáról (SS) szóló irodalmi adatok egészen 1865-ig nyúlnak vissza, amikor a német Simon egy 46 éves férfi térdében operált egy sima felszínű, kocsányos daganatot, míg maga a synovialis sarcoma elnevezés 1934-ben került be a medicinába (1).

A SS a harmadik leggyakoribb malignus lágyrész daganat és a bizonytalan szöveti differenciációt mutató lágyrésztumorok csoportjába tartozik. Testszerte bárhol, bármilyen életkorban kialakulhat, azonban tinédzserek, valamint fiatal felnőttek gyakrabban érintettek. A daganat igen rossz prognózisú, az esetek 80%-ában a végtagokon alakul ki, általában 3-10 cm átmérőjű, beszűri a környező lágyrészeket és gyakran kapcsolódik inakhoz, valamint ér- és idegképletekhez (1-4). Noha a daganatot gyakran ízületek környezetében diagnosztizálják, sejtjei nem a synoviumból eredeztethetők (5).

A tumor az esetek felében lokálisan kiújul (6), valamint a betegek 10-15%-ában hajlamos a véráram útján áttéteket képezni, leggyakrabban a tüdőben és a csontokban. Ritkábban a regionális nyirokcsomók is érintettek lehetnek (7, 8). SS diagnózisa esetén a legfontosabb prognosztikai faktorok a tumorméret, a grade, a beteg életkora és a tumormentes sebészi szélek (9). A legjobb kimenetelre gyermekkorban lehet számítani, ha a tumor kisebb, mint 5 cm, kevesebb, mint 10 mitózis figyelhető meg 10 nagy nagyítású látótérben, nincs necrosis és a tumor lokálisan az épben távolítható el (10-12). Az 5 éves túlélés 60-80%-ra tehető, míg a 10 éves túlélés 40-50% (13).

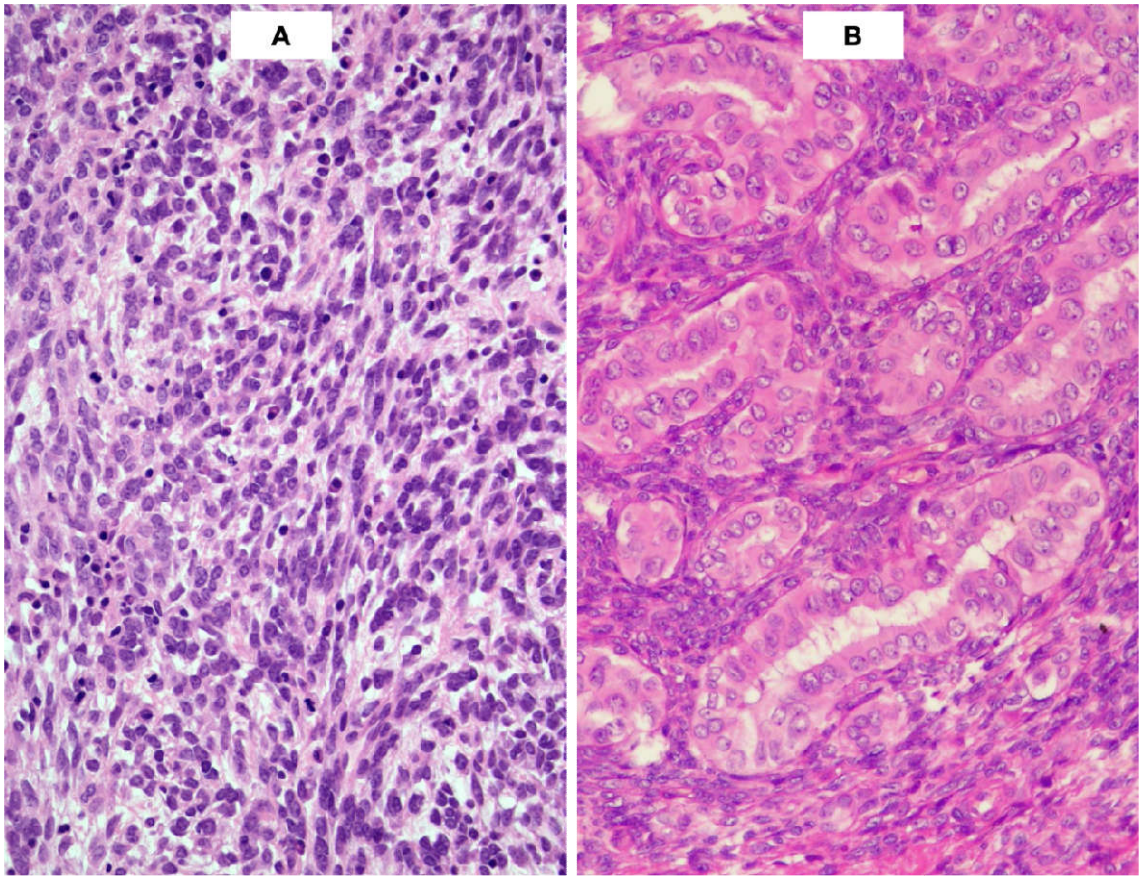
A SS kezelése magában foglalja a sebészi, kemo-és/vagy radioterápiát, mely nagyban függ a stádiumtól és a prognosztikai faktoroktól. A nem metastatizáló, felszínes, kis daganatokat a végtagokon általában csak sebészi úton kezelik széles kimetszést alkalmazva, míg a nagyobb, mélyebben elhelyezkedő tumoroknál ezt kiegészítik sugárterápiával, illetve az előrehaladott betegség esetén kemoterápiával (14).

A SS epithelialis és/vagy mezenchimális irányú differenciációt mutat (3). Szövettanilag 2 csoportja különböztetendő meg: monofázisos és bifázisos (15). A monofázisos SS általában csak orsósejtekből áll, a bifázisos alcsoport az orsósejtek mellett epithelialis jellegű sejtfészkeket is tartalmaz (1. ábra). A monofázisos csoporton

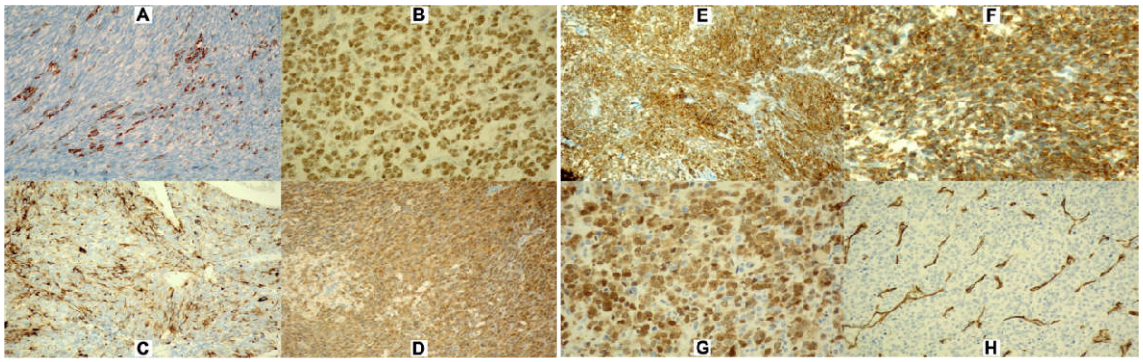
belül elkülöníthető egy alacsonyan differenciált forma, mely egy kifejezetten sejtdús daganat, nagy számú mitózissal, kifejezett necrosissal és celluláris atypiával. Az orsósejtek kötegekbe rendeződnek, egyformák, kicsik, ovális, halványan festődő maggal rendelkeznek. Az epithelialis komponens magjai szintén oválisak, bőséges citoplazmát tartalmaznak, gyakran fészkekbe, kötegekbe rendeződnek és mirigyre emlékeztető struktúrákat formálnak (15, 16).

Immunfenotípusukat tekintve a SS több, mint 90%-ban expresszálja a cytokeratint. Monofázisos SS-ban a cytokeratin fokálisan, elszórtan egy-egy sejtben, vagy az orsósejtek alkotta kötegekben, egyes sejtcsoportokban pozitív, míg bifázisos SS-ban az epithelialis komponens mindig pozitív. Emellett EMA pozitivitás is látható, mely néha a keratin pozitivitásnál is kifejezettebb lehet. A daganatot diffúz, erős magi TLE1 és β-catenin festődés mellett diffúz Bcl2 pozitivitás és 60%-ban CD99 festődés jellemzi. A mezenchimális markerek közül az S100 30%-ban pozitív, míg desmin negatív. A CD34 szintén negatív a tumorsejtekben (14, 17-19) (2. ábra). A SS a csökkent SMARCB1 expressziót mutató daganatok közé tartozik. Kohashi és munkatársai összesen 95 SS-ból származó mintát vizsgáltak és kimutatták, hogy a tumorok ~70%-ában csökkent a SMARCB1 fehérje expresszió (20). Kadoch és Crabtree feltárták, hogy ennek hátterében a SS-ra jellemző SS18-SSX fúziós transzkriptum megváltozott működése állhat (21).

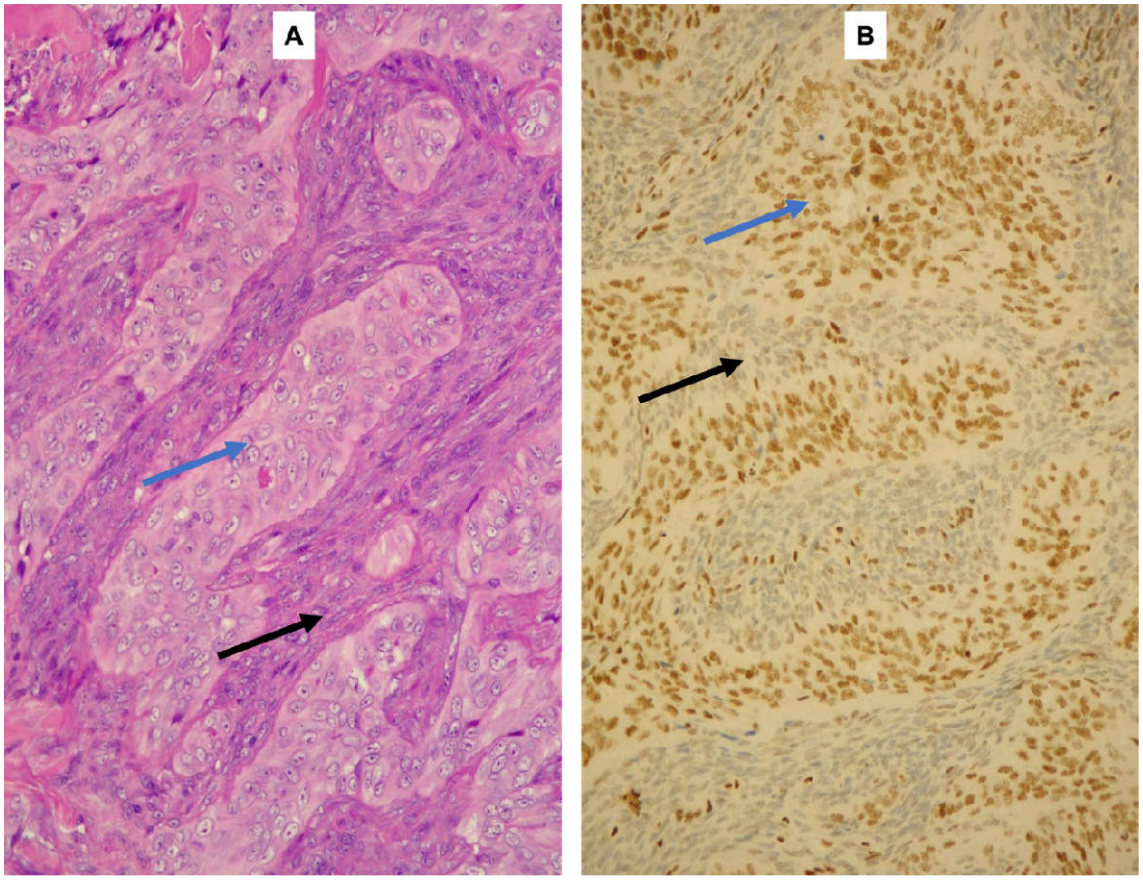
Munkacsoportunk tovább vizsgálta a fehérjecsökkenés hátterét és felfedte, hogy bifázisos synovialis sarcomában az epithelialis komponens sejtjei megtartott SMARCB1 expressziót mutatnak, míg az orsósejtek igen gyengén és/vagy negatívan festődnek (4. ábra), melynek hátterében a miR-206, miR-381 és miR-671-5p miRNS-ek overexpressziója áll (22) (3. ábra).



1. Ábra: Monofázisos (A; 20x nagyítás) és bifázisos (B; 20x nagyítás) synovialis sarcoma HE (hematoxilin-eozin) festett képe.



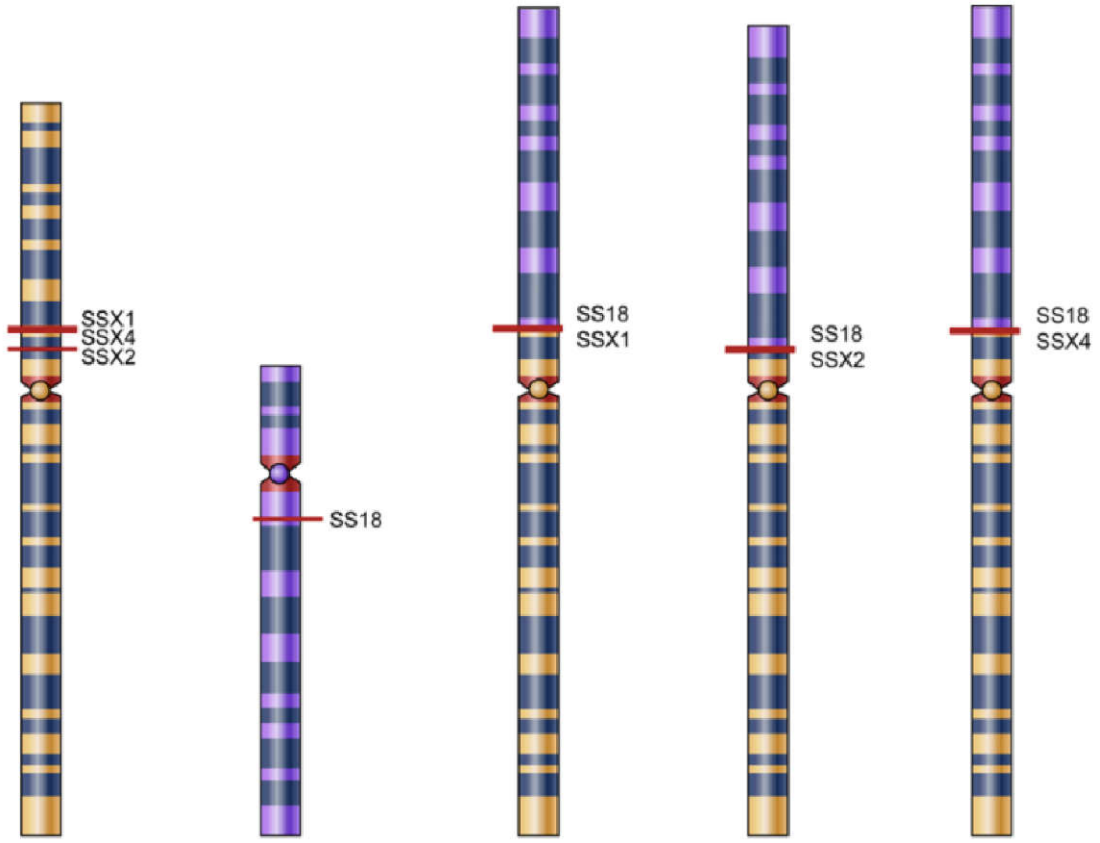
2. Ábra: Synovialis sarcoma jellegzetes immunhisztokémiai festődése: cytokeratin (A), TLE1 (B), EMA (C), β-catenin (D), Bcl2 (E), CD99 (F), S100 (G) és CD34 (H) immunhisztokémiai reakciók (4 x nagyítás).



3. Ábra: Bifázisos synovialis sarcoma HE festett (A; 20x nagyítás) és SMARCB1 immunhisztokémiai képe (B; 20x nagyítás). Jól látszik az orsósejtek negatív (fekete nyíl) és az epithelsejtek pozitív (kék nyíl) festődése.

A kizárólag SS-ra jellemző specifikus *SS18-SSX* transzlokációt Clark írta le először 1994-ben (23). Azóta a transzlokáció fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH), valamint a fúziós géntermék kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (q-RT-PCR) történő kimutatása a hagyományos immunhisztokémiai festések mellett a diagnózisalkotás részét képezi (24). A 18-as kromoszómán lévő *SS18* (SYT) gén az esetek kétharmadában az X kromoszómán lokalizált *SSX1*, egyharmadában az *SSX2* és ritkán az *SSX4* génnel fúzionál (4. ábra) (25). A létrejövő kimérikus génről keletkező kimérikus fehérjében az SS18 fehérje C-terminálisán elhelyezkedő 8 aminosava kerül az

SSX fehérje C-terminálisán lévő 78 aminosava mellé (23, 26, 27). Habár az így létrejött kimérikus gén terméke transzkripciót aktiváló és represszáló tulajdonságokkal egyaránt rendelkezik, DNS-kötő domén hiányában mégsem tud közvetlenül a DNS-hez kötődni (28). Az SS18 SNH doménje révén a SWI/SNF kromatin-átrendező komplex-szel kerül kapcsolatba és képes elősegíteni a transzkripciós aktivációt, míg az SSX az SSXRD doménjén keresztül az EZH2-höz kapcsolódik, és ilyen módon a transzkripciós represszióra van hatással (12, 13, 29).



4. Ábra: A synovialis sarcoma jellemző transzlokációi. A bal oldali két kromoszóma az intakt X (sárga) és 18-as (lila) kromoszómákat ábrázolja, míg a jobb oldali három a kromoszómatörés és fúzió utáni SS18-SSX1, SS18-SSX2 és SS18-SSX4 kimérikus kromoszómákat jelöli (14).

A synovialis sarcoma kialakulásának hátterében a fúziós génnek tulajdonítottak szerepet (30). Cadoch és Crabtree felfedezték, hogy a vad típusú (WT) SS18 fehérje a BAF-komplex igen stabil alegysége. Ha az SS18 fúzionál az SSX-szel, akkor a keletkező SS18-SSX fehérje kötődik a komplex-hez és kiszorítja onnan a WT SS18 és a tumorszuppresszor SMARCB1 molekulákat. Ezek áthelyeződnek és a SMARCB1

proteoszómális degradáción megy keresztül. Az így kialakult megváltozott komplex kötődik a Sox2-höz és megszünteti a H3K27 Me3 repressziót, ezáltal a Sox2 aktiválódik és beindul a proliferáció (21). Munkacsoportunk azonban emellett a miR-206, miR-381 és miR-671-5p miRNS-eknek is fontos szerepet tulajdonít a fehérjecsökkenés kialakításában tekintettel arra, hogy bifázisos SS szövetben ugyan a fúziós gén minden sejtben expresszálódik, a SMARCB1 fehérje kifejeződése ennek ellenére csak az orsósejtekben figyelhető meg (22) (3. ábra).

1.2. A SMARCB1 gén és szerepe a SWI/SNF kromatin-átrendező komplexben

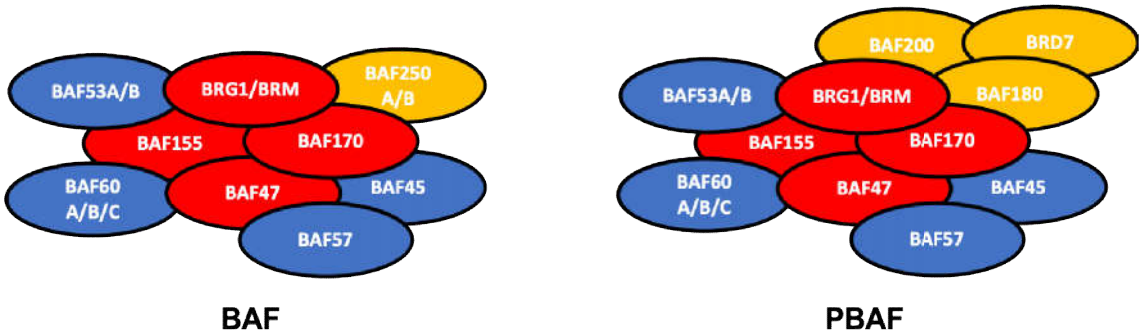
1.2.1. A *SMARCB1* gén nevezéktana

Felfedezése óta a *SMARCB1* génnek 4 elnevezése ismert. Először szacharóz erjesztésre képtelen élesztőben azonosították és az SNF5 (Sucrose non- fermenting gene number 5) névvel illették (31). Ezután következett a humán homológ azonosítása, ami a HIV (humán immundeficiencia vírus) integráz fehérjével való kölcsönhatása miatt kapta az INI1 (Integrase Interactor 1) nevet (32). Időközben kiderült, hogy a fehérje a SWI/SNF kromatin-átrendező komplex tagja (33), ezért napjainkban a HUGO (Human Genome Organisation) *SMARCB1* (SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1) néven tartja számon (34). Ez utóbbi elnevezés utal a gén funkcionális szerepére is. Emellett szintén elterjedt a BAF47 név, amelyben a BAF a ’Brahma gene (BRM) or Brg1-associated factors’ név rövidítése, a 47-es szám pedig a génről kifejeződő fehérje tömegére utal, ami 47 kDa (34). Ez az elnevezés inkább a génről kódolt fehérje tulajdonságaival hozható összefüggésbe. Jelen értekezésben a HUGO által elfogadott és hivatalos *SMARCB1* nevet használjuk.

1.2.2. A *SMARCB1* gén elhelyezkedése a SWI/SNF kromatin-átrendező komplexben

A *SMARCB1* gén a 22-es kromoszóma hosszú karjának 22q11.23-as régiójában helyezkedik el (35), és a SWI/SNF ATP-függő kromatin-átrendező komplex központi alegységét kódolja (36). A SWI/SNF kromatin-átrendező komplex központi és variábilis fehérje alegységekből épül fel (5. ábra). Előbbieket egy ATP-áz alegység

(BRM vagy Brg1) és 3 fő alegység (BAF155, BAF170 és BAF47) alkotja. A variábilis alegységek (BAF53A/B, BAF60A/B/C, BAF57, BAF45A/B/C/D, BAF250A/B, BAF200, BAF180, BRD7) összetételét mindig az adott sejttípus határozza meg (37). A SWI/SNF kromatin-átrendező komplex ATP energiájának felhasználása révén képes a nukleoszómák áthelyezésére, ezáltal a génexpresszió szabályozására (36).



5. Ábra: A SWI/SNF kromatin-átrendező komplex. Piros színnel a központi alegységeket, kékkel a variábilis alegységeket jelöltük. A sárga domének az interaktív alegységek, melyek összetétele alapján két fő variáns ismert: a BAF és a PBAF (Polybromo BAF). (Kalimuthu SN és munkatársai alapján módosítva (37)).

1.2.3. A *SMARCB1* gén funkciói

A normál sejtek a *SMARCB1* gént állandóan kifejezik (38). Egérben a homozigóta *SMARCB1*-deficiencia korai embrionális elhalást okoz, míg a heterozigóta *SMARCB1*-deficiencia az élet korai szakaszában (5. hét) agresszív tumorok kialakulásához vezet, melyek szövettanilag a humán rhabdoid tumorokra emlékeztetnek (39, 40). A *SMARCB1* kiesés fenti hatásai igen gyorsan kialakulnak, összehasonlítva egyéb tumorszuppresszorok kiesésével. Például a *p53* vesztés 20 hetes korban, a *p19Arf* inaktiváció a 38. hétben, a *p16INK4a* vesztés 60 hetes korban okoz daganatot (34, 41). A génvesztés okozta rapid elhalálozás és tumorképzés teszi a *SMARCB1* gént erős tumorszuppresszorrá (34, 41). Több munkacsoport is feltételezte, hogy a *SMARCB1* vesztésnek köszönhetően a sejtekben DNS-mutációk és kromoszóma-instabilitás halmozódik fel, azonban kiderült, hogy a génvesztés nem jár a DNS-hibajavítás károsodásával, sőt igen ritka, hogy a *SMARCB1* vesztésen kívül egyéb mutációk is jelen legyenek a daganatokban (42-45). Ezekből arra következtettek, hogy a *SMARCB1*

vesztés okozta tumorképződés és fokozott progresszió a transzkripciós szabályozáson keresztül epigenetikai módosítások révén következik be (34, 42-45).

A SMARCB1 szerepe a SWI/SNF kromatin-átrendező komplexben nem teljesen tisztázott (46-48). Számos interakciót írtak le a SMARCB1 és különféle jelátviteli útvonalak között. Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a gén jelenleg ismert funkcióit.

A SMARCB1 aktiválja a p16/Rb útvonalat, a hiszton deacetiláz direkt kötésével represszálja a Cyclin D1 (CCND1) transzkripciót és gátolja interakcióját a ciklin-dependens kináz 4/6-tal (CDK4/6). Így a Retinoblastoma (Rb) hipofoszforilálódik, valamint a p16INK4a (p16) indukálódik. Az egész folyamat eredményeként a sejtek G0/G1 fázisban maradnak (49-51).

A SMARCB1 gátolja a sonic hedgehog (SHh) útvonalat, melynek fontos szerepe van az egyedfejlődés szabályozásában. A SMARCB1 közvetlenül gátolja a *GLI-1* (glioma-asszociált onkogén homológ 1) transzkripciót, így csökkent mennyiségű célgén kerül átírásra (34).

A SMARCB1 kulcsszerepet tölt be a Wnt/β-catenin útvonal szabályozásában is. A gén vesztése a Wnt útvonal aberráns aktiválásához vezet, ami fokozott proliferációt eredményez (34, 52). Emellett fontos szerepet játszik a *c-Myc* (53, 54) és az *Aurora A* expresszió regulációjában is (55).

A fentiek mellett a SMARCB1 a Polycomb útvonal fehérjéivel is kapcsolatban áll (56, 57). Az EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) hiszton-metiltranszferáz a PRC2 (Polycomb repressive complex 2) komplex katalitikus alegységeként ismert. Ez a komplex felelős a H3-as hiszton 27-es lizin oldalláncának trimetilációjáért (H3K27 Me3), ami központi szerepet játszik az epigenetikai géncsendesítésben és az onkogén transzformációban (57, 58). Ezzel ellentétben a SMARCB1 a SWI/SNF kromatin-átrendező komplex-szel közvetetten ugyanezen hiszton acetilációjáért felelős, ezáltal a génexpressziót felerősíti és a tumorszuppresszor gének transzformációját segíti elő (56). A PRC2 antagonizál a SMARCB1-gyel és azt inaktiválva az emelkedő EZH2 expresszió miatt fokozódik a H3K27 trimetiláció, ezáltal a tumorszuppresszor gének kifejeződése csökken. *SMARCB1* kiesés esetében a fenti egyensúly megbomlik és eltolódik az EZH2 javára, beindítva ezzel az onkogén transzformációt (56, 57, 59). Összefoglalva a fentieket a SMARCB1 a genom stabilitásának ellenőrzését végzi, a

sejtciklus progresszióját szabályozza, tumorszuppresszor hatását a transzkripció regulációján keresztül fejti ki.

1.2.4. A *SMARCB1*-deficiens tumorok

A *SMARCB1* génfunkció elvesztése a malignus rhabdoid tumorokban (MRT) vált ismertté (35, 60). Ezek az agresszív daganatok fiatal gyermekkorban alakulnak ki a központi idegrendszerben, a vesében vagy a lágyrészekben (61). A MRT mellett számos más daganattípusban is igazolták a *SMARCB1* deficienciáját, mint például epithelioid sarcomában (ES), vese medulláris carcinomában, epithelioid malignus perifériás ideghüvely tumorban (EMPNST), myoepithelialis carcinomában, extrasceletális myxoid chondrosarcomában és alacsonyan differenciált chordomákban (38, 62). A *SMARCB1*-deficiens tumorokat jelenleg 3 nagy csoportba soroljuk az aberráns SMARCB1 fehérje expressziója alapján: az expresszió teljes hiányát mutatók, a mozaikos expressziót mutatók és a csökkent expressziót mutatók (1. táblázat).

1. Táblázat: A *SMARCB1*-deficiens tumorok

<table>
<tr><th>Teljes vesztés</th><th>Mozaikos expresszió</th><th>Csökkent expresszió</th></tr>
<tr><td>Malignus rhabdoid tumor</td><td rowspan="3">Schwannomatosis</td><td rowspan="6">Synovialis sarcoma</td></tr>
<tr><td>Epithelioid sarcoma</td></tr>
<tr><td>Vese medullaris carcinoma</td></tr>
<tr><td>EMPNST</td><td rowspan="2">GIST</td></tr>
<tr><td>Myoepithelialis carcinoma</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Alacsonyan differenciált chordoma</td><td>Extraskeletalis myxoid chondrosarcoma</td></tr>
<tr><td>Osszifikáló fibromyxoid tumor</td></tr>
</table>

Az expresszió teljes hiánya a MRT-ok 98%-ában, a vese medulláris carcinomák 100%-ában kimutatható (38). MRT esetén a *SMARCB1* kiesése a biallélikus génkárosodás (deléciók és/vagy inaktivációs mutációk) miatt alakul ki (63-65). ES-ban a proximális típusú daganatok 76-100%-ában, míg a konvencionális típusnál 81-93%-ban vész el a SMARCB1 expresszió (66-70). ES-ban a SMARCB1 kiesés hátterében kisebb százalékban (~19%) mutatható ki a gén biallélikus mutációja, a fehérjevesztést gyakran a *SMARCB1* mRNS-ének miRNS-ek általi csendesítése okozza (71, 72). Ez utóbbi megfigyelésünket munkacsoportunk korábbi tranziens miR-206 transzfekciós kísérletei is alátámasztották: a transzfektált Caco2, HT-1080 és HDFα sejtvonalakban

24 órával a transzfekciót követően szignifikánsan csökkent a *SMARCB1* mRNS expresszió, illetve a HDFα sejtekben a SMARCB1 fehérje expresszió is lényeges csökkenést mutatott (71).

A mozaikos SMARCB1 expressziót mutató csoportba tartozó daganatok közül a schwannomatosisok nagy része (55-93%) fókuszokban mutat csökkent expressziót, egyes magokban nincs fehérje expresszió, másokban van (73). Az esetek döntő többségében a háttérben a gén missense mutációi állnak, melynek köszönhetően a kifejeződő fehérje aktivitása eltér a normálistól (74). Gastrointestinalis stromális tumorokan (GIST) az esetek felében látható mozaikos SMARCB1 expresszió (75), amit a 22-es kromoszóma teljes hosszú karjának elvesztése okozhat (76).

A csökkent expressziót mutató csoportba az 1.1. fejezetben tárgyalt synovialis sarcoma tartozik. A SMARCB1 fehérje csökkent expressziót Kohahsi és munkatársai mutatták ki először (20), majd Kadoch és Crabtree vizsgálták ennek lehetséges hátterét (21).

1.3. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok

A genomban kódolt genetikai információ megfelelő kifejeződéséhez epigenetikai szabályozó mechanizmusokra van szükség. Az utóbbi években egyre több információval rendelkezünk ezekről a folyamatokról, mivel a normál egyedfejlődés és a kromoszómák szerkezetének kialakítása mellett fontos szerepet töltenek be a tumorképződésben is (77, 78).

Az epigenetikai szabályozó mechanizmusok közé a különböző típusú hiszton modifikációk, a DNS metiláció, a kromatin-átrendeződés és a nem kódoló RNS szakaszok által végrehajtott módosítások tartoznak (79).

1.3.1. Hiszton modifikáció

A sejtmagban a DNS úgynevezett hiszton fehérjék köré csavarodva nukleoszómákat képez, melyek további kompaktálódást követően kromatint alkotnak. A hiszton fehérjék DNS-sel és más magi fehérjékkel való kölcsönhatása poszt-transzlációs módosítások révén befolyásolható. Ezek lehetnek többek között metilációk, acetilációk,

foszforilációk. (80). A módosítások speciális aminosavakon történnek, többnyire az N-terminálison elhelyezkedő lizinen, hisztidinen és argininen. A hiszton metiláció hatására a hisztonok erősebben kötődnek a DNS-hez, így az érintett DNS szakaszról nem történik transzkripció, vagy gyengébb kapcsolódásuk révén nő a transzkripciós aktivitás. Ez attól függ, hogy milyen hisztonon következik be a metiláció (81, 82). A H3 lizin4 (H3K4; H3 hiszton alegység 4. pozíciójában lévő lizin), a H3 lizin36 (H3K36) és a H3 lizin79 (H3K79) metiláció a génátírás fokozódását, míg a H3 lizin9 (H3K9), a H3 lizin27 (H3K27) és a H4 lizin20 (H4K20) metiláció a génátírás csökkenését okozza (81, 82). A metiláció reverzibilis folyamata során a specifikus hiszton-metiltranszferáz az aminosavak hidrogénjeit 1, 2 vagy 3 metilgyökre cseréli (83). Számos humán daganatban kimutatták a hiszton metilációért felelős fehérjék mutációját vagy expressziójuk módosulását (57). Példa erre a 3.1.3. fejezetben már említett H3K27 trimetilációt végző EZH2 metiltranszferáz. Synovialis sarcomában az EZH2 felülszabályozódik, expressziója megnő, és pozitív korrelációt mutat a daganatos progresszióval, valamint az előnytelen klinikai kimenetellel (84). A másik széleskörűen tanulmányozott hiszton modifikációs mechanizmus a hiszton acetiláció. A folyamat során a pozitív töltésű hisztonok a hiszton-acetilázok révén negatív töltésűvé válnak ezáltal a hiszton DNS-hez való affinitása csökken, így a DNS szabaddá válik a transzkripciós faktorok és enzimek számára (85, 86).

1.3.2. DNS metiláció

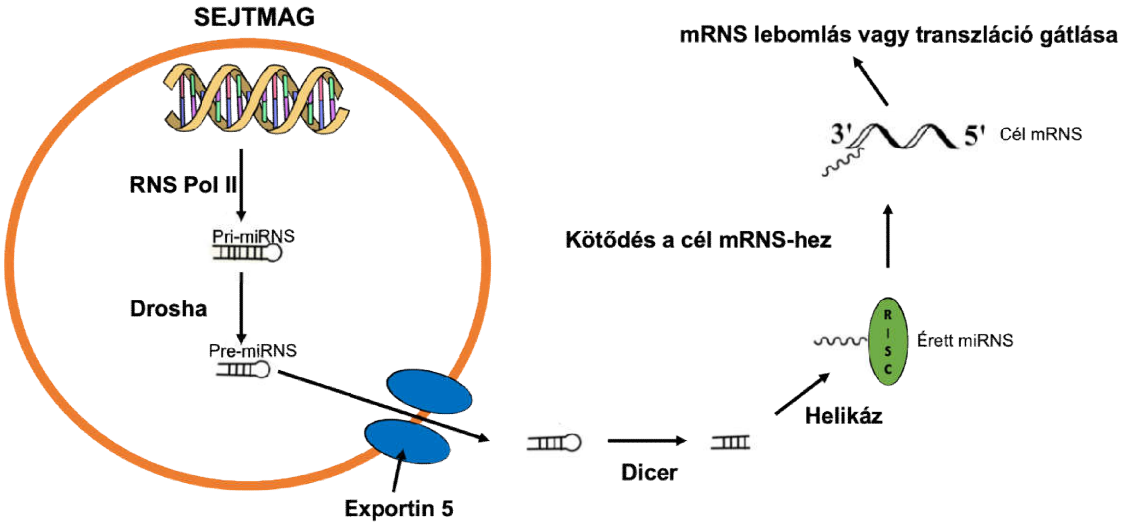
A DNS metiláció a génexpresszió szabályozás egy másik lehetséges mechanizmusa. A DNS metilációt DNS-metiltranszferáz enzimek végzik nagyrészt a CpG gazdag génrégiókban. Ezek a CpG szigetek a gének promóter régiójában helyezkednek el. Normál sejtekben az egyik példája ennek az X-kromoszóma inaktivációért felelős CpG metiláció (87). Tumorsejtekben leggyakrabban a tumorszuppresszor gének promóter régiójának metilációja mutatható ki, ami a tumorszuppresszor funkciójának elvesztéséhez vezet (88).

1.3.3. mikroRNS-ek (miRNS-ek)

A nem kódoló RNS-ek (noncoding RNA; nc-RNA) transzlációra nem kerülő átírt RNS szakaszok (89). Csoportosításuk méretük alapján lehetséges hosszú (200 bp feletti) és rövid (200 bp alatti) nem kódoló RNS-ekre. Az utóbbi időben derült fény arra, hogy ezek a nukleinsav szakaszok a normál egyedfejlődésben és a betegségekben egyaránt fontosak (90). A rövid nem kódoló RNS-ek közé tartoznak az RNS-interferenciáért felelős miRNS-ek és siRNS-ek (small interfering RNA).

1.3.3.1. A miRNS-ek keletkezése, érése

A miRNS-ek 16-29 nukleotid hosszú, nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, melyek funkciójukkal a génexpresszió poszt-transzkripcionális szabályozását teszik lehetővé. A miRNS gének fehérjét kódoló gének intronjaiban vagy intergénikusan, egyedi génként fordulnak elő (91). Átírásukat az RNS polimeráz II enzim végzi. Kialakulásuk során először mintegy 1 kb nagyságú duplaszálú elsődleges, vagyis primer miRNS (pri-miRNS) keletkezik a sejtmagban, mely a Drosha RNáz III hasítására rövidebb, szintén duplaszálú hurkos prekurzor miRNS-sé (pre-miRNS) alakul. Ezután a pre-miRNS az Exportin-5 magi membránfehérjén keresztül a citoplazmába kerül. Itt a Dicer endonukleáz hasítja és az így létrejövő kétszálú RNS egy helikáz enzim segítségével egyszálúvá válik. Végül a RISC-komplexbe (RNS induced silencing complex) kerülve tölti be specifikus szerepét az mRNS represszióban vagy hasításban (6. ábra) (92).



6. Ábra: A miRNS-ek keletkezésének vázlata.

1.3.3.2. miRNS-ek a tumorképződésben

A miRNS-ek 1993-as felfedezése óta kiderült, hogy működésük a legtöbb daganatban zavart szenved (93). A miRNS-ek onkomiRNS-ként (onkomiR) és szuppresszor miRNS-ként (szuppresszor miR) funkcionálhatnak a különböző daganatokban. Az onkomiR-ek általánosságban overexpresszáltak, így tumorszuppresszor gének mRNS-ét tudják represszálni, hasítani. A szuppresszor miR-ek alulexpresszáltak a tumorokban, ezáltal az onkogének transzlációja végbemehet (94). Ha az onkomiR-eket gátoljuk, vagy a szuppresszor miR-eket stimuláljuk, akkor a tumorsejtek proliferációja, a metastasis képzés csökken, a túlélés javul (95). A miRNS-ek egyszerre több száz protoonkogén és tumorszuppresszor célpontot szabályozhatnak, így a daganatokban betöltött szerepük pontos tisztázásához kiemelten fontos a célpontok biológiai funkciójának ismerete (93). A miRNS-ek amellett, hogy a tumorképződés pontos mechanizmusának megértését elősegíthetik, biomarkerként is alkalmazhatók egyes daganattípusokban, mely által pontosítható a diagnózis és következtetni lehet a prognózisra (96, 97).

1.3.3.3. A miR-206

A miR-206 a myomiR-ek családjába tartozó miRNS. Ezek a miRNS-ek elengedhetetlenek a normál váz-és szívizom fejlődéséhez, de szerepük van az idegek, agyi struktúrák, zsír-és immunsejtek kialakulásában is (98). A miR-206 bizonyos daganatokban (rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, chondrosarcoma, emlőrák, melanoma, tüdőrák) szuppresszor miR-ként (99-104), míg epithelioid sarcomában, synovialis sarcomában és más *SMARCB1*-deficiens lágyrész daganatokban onkomiR-ként funkcionál (22, 71), tehát biológiai működése a tumor mikrokörnyezet jelentős befolyása alatt áll.

A miR-206 számos célgénjét azonosították az utóbbi időszakban (105, 106). Ilyen például a *SMARCB1* gén, amit a miR-206 *in vitro* tranziens transzfekciót követően 24 és 48 órával mind mRNS, mind fehérje szinten csendesített (71). A *SMARCB1* mellett az *ACTL6A*, a *CCND1*, a *POLA1*, a *NOTCH3*, a *MET* és a *G6PD* is a miR-206 célgénjei közé tartoznak. Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a felsorolt gének szakirodalomból ismert funkcióit. Az *ACTL6A*, vagy más néven BAF53A a SWI/SNF

kromatin-átrendező komplex variábilis alegységét kódolja és mint onkogén írták le rhabdomyosarcomában (99). A *CCND1* szintén onkogén és a sejtciklusban a G1 fázisból S fázisba való átjutást segíti a CDK4/6 molekulával komplexet alkotva (107). A *POLA1* gén kódolja a DNS polimeráz αI p180 alegységét (108). A *NOTCH3* onkogénként fontos szerepet játszik a NOTCH jelátviteli útvonalban és overexpresszálódik számos daganatban (109). A *MET* mint protoonkogén a Met tirozin-kináz receptort kódolja és fontos szerepet tölt be a vázizmok differenciációjában (110). A *G6PD* a glukóz-6-foszfát dehidrogenázt kódolja és a pentóz-foszfát útvonalon a nukleinsavszintézisben elengedhetetlen jelentőségű NADPH-t és ribóz-5-foszfátot termel. Tumorokban onkogénként funkcionál, aktivitása emelkedik, például egér embrionális fibroblasztokba transzfektálva, majd a sejteket egerekbe oltva fibrosarcomát formál (111). A *SNAI1* nem közvetlen célpontja a miR-206-nak, azonban az epithelialis mezenchimális tranzíció (EMT) egyik fontos markere. EMT esetén az epithelialis sejtek mezenchimális sejtekké differenciálódnak, melyet a *SNAI1* expresszió növekedése és az E-Cadherin expresszió csökkenése jelez, és ugyanígy fordítva a mezenchimális epithelialis tranzíció esetén (112).

1.4. Fúziós transzkriptumok mint likvid biopsziás markerek lágyrész daganatokban

A ’likvid biopszia’ elnevezés bármely testfolyadékból (vérből, vizeletből, nyálból, stb.) történő mintavételt jelent, s egy kevéssé invazív, könnyen kivitelezhető módszerként áll rendelkezésre a klinikailag hozzáférhetetlen daganatok esetén. A felsorolt testfolyadékokban a daganatból kikerülő keringő sejtmentes nukleinsavak, illetve szabadon keringő tumorsejtek találhatók, melyek magas érzékenységű molekuláris technológiák segítségével detektálhatók. A véráramba kerülő, szabadon keringő molekulák lehetnek exoszómába csomagolt nukleinsavak, lipidek, fehérjék, önálló DNS vagy RNS darabok, miRNS-ek, hosszú nem kódoló RNS-ek. A likvid biopszia módszere napjainkban népszerű eszközévé vált a terápiás hatékonyság követésének, illetve az esetleges mérhető reziduális betegség (MRB) kimutatásának (113).

Perifériás vérből már számos szolid daganat (tüdőrák, vastagbélrák, stb.) esetén mutattak ki tumor eredetű szabad nukleinsavakat és szabadon keringő tumorsejteket (114, 115), azonban a csont- és lágyrésztumorok tekintetében idáig döntően a Ewing

sarcomát tanulmányozták (116, 117). A fúziós géntermék vérből történő kimutatása a visszatérő transzlokációkat hordozó sarcomák esetén megbízható markere lehet a keringő tumorsejtek és szabad nukleinsavak detektálásának, mint azt a Ewing sarcoma esete is mutatja (118).

A szakirodalom összesen 2 beteget említ, akiket synovialis sarcomával diagnosztizáltak és a vérükben kimutatható volt az SS18-SSX fúziós transzkriptum (119, 120). Fricke és munkatársai SS sejtvonalakban és a sejtekből a tápfolyadékba kerülő mikrovezikulákban fedezték fel a fúziós transzkriptumot, azonban synovialis sarcomás betegek perifériás vérében sem a sejtes frakció, sem a mikrovezikulák nem tartalmazták a kimérikus géntermeket (121). Primer daganatokban a fúziós fehérje kimutatása tűnik az egyik legmegbízhatóbb diagnosztikus módszernek synovialis sarcoma esetén, mivel azt csak a tumorsejtek expresszálják. Ezzel szemben a miR-206 vérből való kimutatása tekintettel arra, hogy számos normál sejtben is expresszálódik kevésbé lenne alkalmas markere a daganat kiújulásának nyomon követésére. A szakirodalomban közölt ellentmondásos eredmények következtében indokolt a keringő fúziós gén vizsgálata SS betegek vérében, hogy kiderüljön, vajon a fúziós transzkriptum likvid biopsziás mintából való kimutatása segíthet-e a betegség prognózisának meghatározásában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a munkacsoportunk által korábban már tanulmányozott *SMARCB1* tumorszuppresszor gén és fehérje expressziójának eltűnését kívántuk mélyrehatóbban vizsgálni *in vitro* sejttenyészeti modellekben. Egy újonnan létrehozott sejtvonal, az SS-iASC segítségével szerettünk volna utánajárni, hogy a synovialis sarcomára jellemző fúziós gén, mint ezidáig elfogadott tumorgenezist iniciáló genetikai eltérés és az általunk kimutatott emelkedett szintű miR-206, mint epigenetikai eltérés hogyan befolyásolja a *SMARCB1* expresszióját *in vitro* modellekben.

Emellett elemezni kívántuk az *SS18-SSX* kimérikus gén jelenlétét SS-val diagnosztizált és kezelésen átesett betegek perifériás vérmintáiban.

Főbb céljaink, feltételezéseink a következők voltak:

1. Az SS-iASC sejtvonalban bizonyítani kívántuk az *SS18-SSX1* fúziós gén mRNS és fehérje szintű expresszióját, illetve vizsgálni kívántuk, hogy a sejtvonalban kimutathatók-e a synovialis sarcomára jellegzetes immunfenotípusbeli eltérések.

2. Előző *in vitro* tranziens kísérleteinkben használt miR-206 miRNS permanens transzfekcióját terveztük a korábbi nem tumoros és tumoros sejtvonalak mellett (HDFα, HT-1080 és Caco2) további két genetikailag módosított sejtvonalban (iASC és SS-iASC), melyekben a *SMARCB1* és a miR-206 további hat célgénjének (*ACTL6A*, *CCND1*, *POLA1*, *MET*, *NOTCH3*, *G6PD*), valamint az EMT marker *SNAI1*-nek az mRNS szintű expresszióját terveztük meghatározni.

3. A miR-206 transzfekciót követően célunk volt az SS18-SSX1 fúziós fehérjét kifejező SS-iASC-206 sejtekben a SMARCB1 fehérje expressziójának vizsgálata.

4. Vizsgálni kívántuk, hogy a synovialis sarcomára patognomikus fúziós géntermék (*SS18-SSX*) kimutatható-e synovialis sarcomás betegek perifériás vérében 6 hónappal a terápiát követően, és ha igen, akkor alkalmas diagnosztikus eszköze lehet-e a betegség követésének.

3. MÓDSZEREK

3.1. Vegyszerek, oldatok, pufferek

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

A sejttenyészeti tápfolyadékok, a foetalis marhaszérum (FBS) és egyéb sejttenyészeti anyagok, mint antibiotikumok, L-Glutamin, nem esszenciális aminosavak, Low Serum Growth Supplement (LSGS), fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), és tripszin-EDTA oldat (0,5 g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA) a Biosera (Kansas, MO, USA), a Sandoz Hungária Kft. (Budapest, Magyarország), a HyClone GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT, USA), a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), a Gibco by Thermo Fisher Scientfic (Waltham, MA, USA) és az Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) termékei voltak. A szövegben részletesen nem specifikált oldatok és pufferek összetétele a 2. táblázatban olvasható.

2. Táblázat: A részletesen nem specifikált oldatok és pufferek összetétele

Oldat vagy puffer neve	Összetétel
Blottoló puffer 10x-es	192 mM Glicin, 25 mM Tris, 10% Methanol
Citrát 10x-es (pH=6)	29,41g $C_6H_5Na_3O_7$*2 H_2O
Laemli- puffer 5x-ös	250 mM Tris-HCL pH=6,8, 50% Glicin, 5% SDS, 0,05%
PBS 10x-es (pH=7,5)	1,7M NaCl, 33,5 mM KCl, 18,4 mM KH_2PO_4, 76,6 mM Na_2HPO_4*2H_2O
SSC 20x-os (pH=7)	175,3 g NaCl; 88,2 g $C_6H_5Na_3O_7$*2 H_2O
SDS-PAGE futtató puffer 10x-es	192 mM Glicin, 25 mM Tris, 0,1% SDS
TAE 10x-es (pH=8,0)	0,4M Tris-HCl, 0,02M EDTA, 11,4ml/l Ecetsav
TBS 10x-es	150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7,5
TBST	1x TBS + 0,05% Tween® 20 (P5927, Sigma-Aldrich)
TE 1x-es (pH=8,0)	10mM Tris, 1mM EDTA
Tripszin-EDTA	0,5 g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA

3.2. Az iASC és az SS-iASC sejtvonalak létrehozása

Az ASC (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejtekkel Tátrai P. és munkatársai dolgoztak először (122). A sejteket hTERT (humán telomeráz reverz transzkriptáz) gén lentivirális bevitelével tették halhatatlanná. Az így létrejött sejtpopuláció az iASC nevet kapta (immortalized adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejt). A létrehozott iASC sejtvonal bizonyítottan megőrizte az eredeti szülői multipotens őssejt tulajdonságait, mint például a normál kariotípust és a több irányban való differenciálódási képességet. Körülbelül 100 populáció-megduplázódást követően az iASC sejtek proliferációja felgyorsult, celluláris szeneszcenciájukat elvesztették és kariotípus-beli rendellenességeket szereztek. Ezeket a késői passzázsban lévő iASC sejteket iASC/2-vel jelölték. Ezt követően az iASC/2 (ezentúl iASC) sejteket synovialis sarcoma szövetéből származó SS18-SSX1 fúziós génnel lentivirálisan transzdukálva létrehozták az SS-iASC sejtvonalat (SS18-SSX1 carrying immortalized ASC, SS18-SSX1 fúziós gént kifejező immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejt). Az így létrehozott iASC és SS-iASC sejtvonalakat Tátrai P. további kísérleteinkhez rendelkezésünkre bocsátotta.

3.3. A sejtkultúrák tenyésztése

Kísérleteinkhez a fent említett két sejtvonalon kívül további két humán tumoros és egy normál, nem tumoros sejtvonalat tenyésztettünk. A HT-1080 humán fibrosarcoma sejtvonalat (ATCC szám: CCL-121) RPMI-1640 tápfolyadékban (Biosera) 10% FBS (fetal bovine serum, Biosera) és gentamicin (Sandoz Hungária Kft., 160 µg/ml) antibiotikum mellett tenyésztettük. A Caco2 humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalat (ATCC szám: HTB-37) minimal essential mediumban (MEM, HyClone, GE Healthcare Life Sciences) L-glutamin (Sigma-Aldrich) kiegészítéssel, 20% FBS (Biosera), 1% nem esszenciális aminosav (Biosera), valamint a fent említett antibiotikum jelenlétében tenyésztettük. A HDFα humán bőr eredetű fibroblaszt sejtvonalat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Medium 106 (Gibco by Thermo Fisher Scientfic) tápfolyadékban, Low Serum Growth Supplement (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával tenyésztettük antibiotikum nélkül. Az iASC és SS-iASC sejtvonalakat DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's

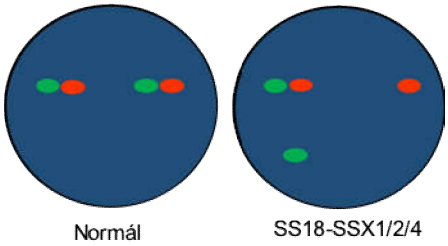
Nutrient Mixture F12, Sigma-Aldrich) tápfolyadékban L-Glutamin (Sigma-Aldrich) kiegészítéssel, 10% FBS (Biosera), fibroblaszt növekedési faktor (bFGF, Fibroblast growth factor-basic, Gibco by Thermo Fisher Scientific, 0.001 µg/ml) és gentamicin (Sandoz Hungária Kft., 50 µg/ml) antibiotikum mellett tenyésztettük. Mind az öt sejtvonal esetén a sejteket 25 vagy 75 cm²-es sejttenyésztő flaskákban (Sigma-Aldrich) tartottuk 5%-os CO_2 koncentráció mellett, 37 °C-on. A médiumokat minden másnap cseréltük a sejteken.

3.4. Fluoreszcens In Situ Hibridizáció (FISH)

A FISH kísérletekhez SS-iASC és negatív kontrollként iASC sejteket tenyésztettünk 25 cm²-es sejttenyésztő flaskákban. A sejteket a médium leöntését és 1x-es PBS-sel való mosást követően tripszin-EDTA segítségével felszedtük a szövettenyésztő edény felszínéről. Ezt követően a sejteket citospin segítségével üveg tárgylemezre centrifugáltuk, szárítottuk, majd -20 °C-os metanol-ecetsav (3:1) keverékével fixáltuk. A minták előkezelése 30 percig tartott 2x-es SSC-ben 37 °C-os vízfürdőben, majd ezt követte az emésztés 10%-os pepszin oldatban (pH=1.0) 15 percen át 37 °C-os vízfürdőben. Desztillált vizes mosás után a mintákat felszálló etanol sorban (70%, 80%, 100%) dehidratáltuk. A Vysis SS18 Break Apart FISH Probe (Vysis, Abbott Park, IL, USA) és az SS18/SSX1 TRICHECK™ Probe (ZytoVision, Bremerhaven, Németország) próbák előírásainak megfelelően 4,5 µl próbát adtunk hozzá a megjelölt (karcolt) területekhez, melyet 18 x 18 mm-es fedőlemezzel és Fixogum ragasztóval (Marabu Co., Bietigheim, Németország) hermetikusan fedtük. A tárgylemezeket ezután ThermoBrite Denaturation/Hybridization System gép (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) feltétjére helyeztük a DNS próbák és a sejtek DNS-ének párhuzamos denaturálása céljából (5 perc, 73 °C), majd egy éjszakán át hibridizáltuk őket 37 °C-on. A fedőlemez eltávolítása után a lemezeket 2 percre 0,4x-es SSC/0,1%-os Igepal (NP-40) (Kreatech, Amszterdam, Hollandia) 73 °C-os oldatába, majd 2 percig 2x-es SSC/0,1%-os Igepal szobahőmérsékletű oldatába helyeztük. A készítményeket ezután szobahőmérsékleten, sötétben, levegőn szárítottuk, majd 10 µl Vectashieldben (a fluoreszcens festékek kiégését gátló anyag) oldott DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) rácsöppentése után fedőlemezzel fedtük. Az így kapott hibridizációs reakciókat az interfázisos sejtek magjában Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, VDS Vosskühler CCD-1300 monokróm

kamerával fotóztuk és LUCIA™ Citogenetics 1.5.6 szoftverrel (Laboratory Imaging, Csehország) értékeltük.

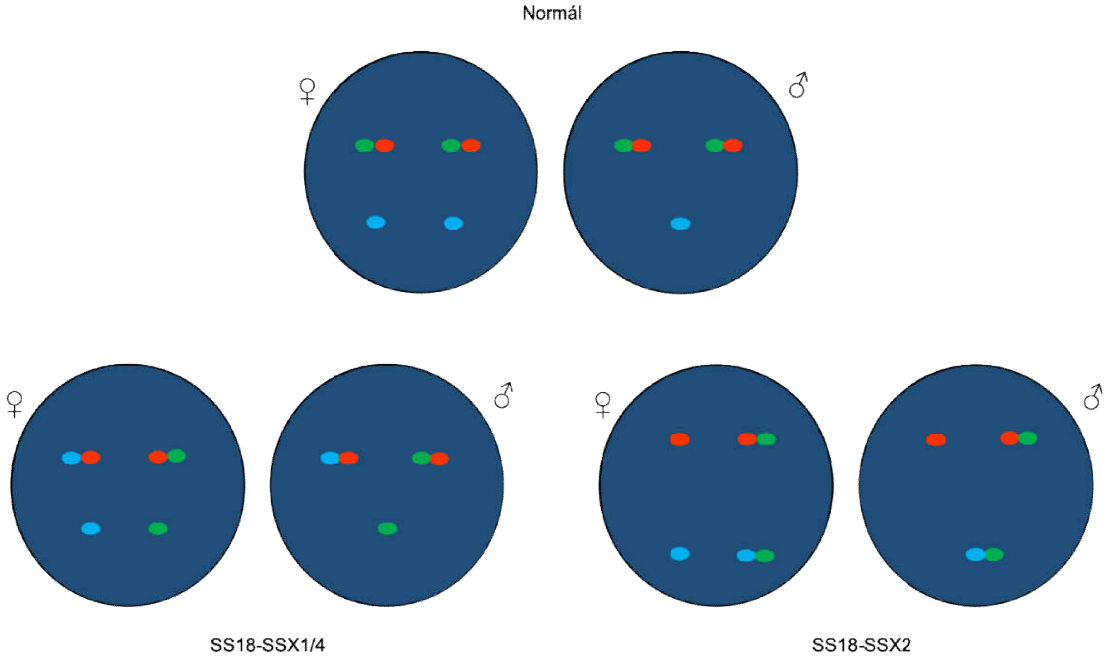
A Vysis SS18 Break Apart Probe (Vysis) specifikus az *SS18* (SYT) lókuszra a 18q11.2-es kromoszóma régióban. A próbát úgy tervezték, hogy az *SS18* gén telomerikus 5' végét narancsvörös színű, míg a centromerikus 3' végét zöld színű fluoreszcens festékmolekulával jelölték. Így a normál, *SS18* génátrendeződés nélküli sejtekben a két jel egymás mellett helyezkedik el, azonban *SS18* géntörés és transzlokáció esetén a jelek eltávolodnak egymástól és látni fogunk egy különálló narancsvörös, egy különálló zöld jelet, valamint egy egymás melletti narancsvörös és zöld jelet (intakt allél). (7. ábra).



7. Ábra: Az SS18 break-apart próba sematikus képe normál és *SS18-SSX* fúziót tartalmazó sejtben.

Az SS18/SSX1 TriCheck™ Probe (ZytoVision) hármas jelölésű próbát úgy tervezték, hogy lefedje az *SS18* gén 18q11.2-es kromoszóma régióját és az Xp11.23-as kromoszóma régiót az *SSX1* gén érintésével. A zöld fluorokrómmal jelölt próba a centromerikus 3' véghez, míg a narancsvörös fluorokrómmal jelölt próba a telomerikus 5' véghez kötődik az *SS18* génben. A kék (aqua) fluorokrómmal jelölt próba az *SSX1* gén centromerikus 3' végéhez kötődik. Egy normál női sejtben 1-1 pár zöld és narancsvörös jel található egymás mellett (*SS18* gén), és 2 kék jel tőlük elkülönülve (*SSX1*). Egy normál férfi sejtben ugyanígy láthatóak 1-1- párban a zöld és narancsvörös jelek, azonban a férfiak egyetlen X kromoszómája következtében csak egy kék jel látható. Egy női sejtben az *SS18-SSX1* (vagy *SS18-SSX4*) fúzió esetén a narancsvörös (*SS18*) jel kolokalizál egy kék jellel (*SSX1*) továbbá látunk egy különálló kék jelet a női nemi XX kromoszómaszám miatt. Egy férfi sejtben az *SS18-SSX1* fúziós gén létrejöttét

ugyanígy a narancsvörös (*SS18*) és a kék (*SSX1*) jel kolokalizációja jelöli. Az *SS18-SSX2* fúzió meglétét a zöld és kék jelek kolokalizációja mutatja (8. ábra).



8. Ábra: Az SS18/SSX1 TriCheck próba sematikus képe normál és *SS18-SSX1/2/4* transzlokációt mutató női, valamint férfi sejtekben.

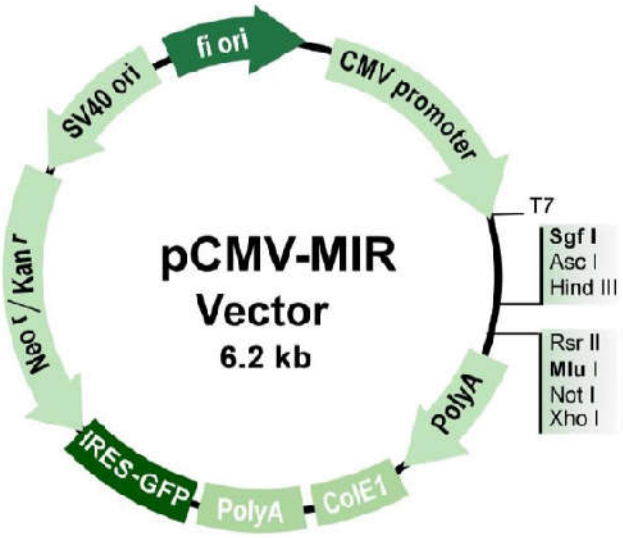
3.5.Kariotipizálás

Kísérleteinkhez SS-iASC és iASC sejteket tenyésztettünk 25 cm²-es sejttenyésztő flaskákban. A sejtek osztódását 100 ng/ml kolcemiddel állítottuk le metafázisban. A termosztátban történt inkubáció után a médiumot leöntöttük és a sejteket 1x-es PBS-sel mostuk, majd tripszin-EDTA segítségével felszedtük a sejttenyésztő edény felszínéről. Ezt követően 37 °C-os, 0,075 M-os hypotoniás KCl oldattal lizáltuk, metanol-ecetsav (3:1) keverékével fixáltuk őket, majd tárgylemezekre kenetet készítettünk és azokat levegőn szárítottuk. Az egyes lépések között a sejteket 1x-es PBS-sel mostuk és 200g-n 5 vagy 10 percig centrifugáltuk. A folyamatot rövid tripszines emésztés és Giemsával (Merck, Darmstadt, Németország) való festés követte, végül a tárgylemezeket fedőlemezzel fedtük. A kariogramokat LUCIA Cytogenetics szoftver (Laboratory Imaging, Prága, Csehország) segítségével elemeztük.

3.6. Permanens miRNS transzfekció

A miR-206-ot permanensen kifejező sejtvonalak létrehozásához az OriGene humán miRNA MIR206 (AC: MI0000490, OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) miRNS plazmidját használtuk transzfekciós kísérleteink során. Az OriGene miRNS prekurzorokba körülbelül 60-70 nukleotidnyi humán genomiális DNS-ből amplifikált pri-miRNS-t (primer miRNS) inszertálnak a pri-miRNS szekvenciájától 3' és 5' irányban lévő úgynevezett „flanking" ragadós végekkel együtt. Ezek a ragadós végek a megfelelő pri-miRNS expresszió és érett miRNS képződés végbemeneteléhez szükségesek. Az így klónozott pCMV6-Mir vektorban a miRNS prekurzor átírását a vektor CMV promótere hajtja. A vektorokat úgy tervezték, hogy a plazmidban lévő neomycin antibiotikum szelekciós marker segítségével létrehozhassuk a stabil, adott miRNS-t kifejező sejtvonalakat, ugyanis nemcsak a miRNS szekvenciája, hanem a neomycin rezisztencia gén is kifejeződik az átírás során. A plazmidba ezen kívül a zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein, GFP) riporter gént is beépítették, amely szintén átíródik, és segítségével a transzfekció hatékonyságát ellenőrizhetjük. A sejtekbe bejutott plazmidról végül érett miRNS-ek keletkezhetnek és specifikus mRNS-eken fejtik ki hatásukat. Kísérleteinkhez negatív kontrollnak az OriGene által javasolt üres vektor pCMV-MIR (AC: pCMVMIR, OriGene Technologies) miRNS plazmidot használtuk. Az üres vektor ugyanúgy tartalmazza a neomycin antibiotikum szelekciós

markert és a GFP riporter gént, de pri-miRNS szekvenciát nem tartalmaz, így sejtekbe való bejutását követően csak az említett két komponens kerül kifejeződésre, gén-csendesítő funkcióval nem rendelkezik (9. ábra).



9. Ábra: Az OriGene humán miRNS plazmid konstrukció sematikus képe. (www.origene.com)

Az említett öt sejtvonalat a Neon™ transzfekciós rendszer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) segítségével elektroporációval transzfektáltuk. A transzfekció a gyártó 10 µl-es pipetta hegyében ment végbe. Az elektroporáció paramétereit az 3. táblázat tartalmazza. Az elektroporáció előtt a sejteket 1x-es PBS-sel mostuk és tripszin-EDTA-val felszedtük a sejttenyésztő flaskák felszínéről. Egy elektroporációs reakcióhoz $4x10^5$ db sejtet centrifugáltunk 800 g-n 10 percig, majd 1x-es PBS-sel mostuk őket. Ezután a sejteket 1 µg miRNS plazmiddal szuszpendáltuk 10 µl „Transfection Resuspension Buffer R" oldatban. Az elegy a Neon készülék pipetta hegyébe felszívva jelentette a reakcióközeget. Az elektroporációt követően a transzfektált sejteket 6-lyukú szövettenyésztő lemez egyetlen reakcióterébe szélesztettük, mely az adott sejtnek megfelelő 2 ml antibiotikumtól mentes tápfolyadékot tartalmazta. A transzfekció hatékonyságát (a GFP expresszió sejtszámra vonatkoztatott százalékos arányát) az elektroporációt követő 24 óra múlva fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük. A következő két hétben az összes sejtvonal esetén a gyártó által javasolt Geneticin® szelekciós antibiotikummal (Gibco by Thermo Fisher Scientfic, 0,05 mg/µl) kezeltük a

miR-206-tal, az üres vektorral transzfektált sejteket és negatív kontrollként a nem transzfektált sejteket.

3. Táblázat: Az elektroporáció paraméterei az egyes sejtvonalak esetén

Sejtvonal	Impulzus feszültsége	Impulzus ideje	Impulzusszám
SS-iASC	1200 V	20 ms	2
iASC	1200 V	20 ms	2
HDFα	1400 V	20 ms	2
HT-1080	950 V	50 ms	1
Caco2	1300 V	20 ms	2

3.7. A permanens miRNS expresszió gátlása miRNS inhibitor transzfekciójával

Az anti-miR™ hsa-miR-206 miRNS inhibitort (katalógusszám: AM17000, Ambion by Thermo Fisher Scientific), a FAM-jelölt anti-miR™ negatív kontrollt (katalógusszám: AM17012, Ambion by Thermo Fisher Scientific) és pozitív kontrollként az anti-miR™ hsa-let-7c miRNS inhibitort (katalógusszám: 4392431, Ambion by Thermo Fisher Scientific) az előbb említett Neon™ transzfekciós rendszer segítségével elektroporációval juttattuk be a nem transzfektált és a miR-206-tal transzfektált sejtvonalainkba. Az elektroporáció paraméterei a 3. táblázatban szereplővel azonosak voltak. A hsa-let-7c miRNS inhibitor, mint pozitív kontroll hatékonyan képes csillapítani a sejtekben konstitutívan kifejeződő let-7c miR-t. A let-7c miR a *HMGA2* mRNS expresszió csendesítését végzi. Az inhibíció következtében a *HMGA2* génexpresszió felszabadul a miR kiváltotta gátlás alól, az így megnövekedett mRNS szint q-RT-PCR módszerrel detektálható. A transzfekció után 24 órával a sejtekből RNS-t izoláltunk.

3.8. Nukleinsavak izolálása

Kísérleteinkhez nukleinsavat (DNS-t és RNS-t) izoláltunk a sejttenyészetekből, a perifériás vérmintákból és két synovialis sarcoma FFPE (formalin-fixált, paraffinba ágyazott) blokkjaiból.

A nukleinsavak izolálásához a sejteket 25 cm²-es sejttenyésztő flaskákban (Sigma-Aldrich) szaporítottuk 48-72 órán keresztül. Az SS-iASC sejtekből DNS-t

izoláltunk a PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) segítségével a gyártó leírásának megfelelően. Az SS-iASC, SS-iASC-206, SS-iASC-üres, iASC, iASC-206, iASC-üres, HT-1080, HT-1080-206, HT-1080-üres, Caco2, Caco2-206, Caco2-üres sejtekből RNS-t izoláltunk a PureLink RNA Mini Kitet (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) felhasználva a gyártó utasításait követve.

A vizsgálatainkba bevont 15 betegtől a Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Onkológiai Osztálya 10 ml perifériás vért vett. A mintavételre minden páciens esetén 6 hónappal a sebészi beavatkozás és/vagy kemoterápia után került sor. Az összes mintát azonnal feldolgoztuk a vérvételt követő egy órán belül. A vérmintákból RNS-t izoláltunk TRIzol® (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) reagenssel a gyártó utasításainak megfelelően. (Pozitív kontrollként az igazoltan *SS18-SSX1* fúziót hordozó SS-iASC sejtekből (123) és két synovialis sarcoma eset FFPE blokkjából izolált RNS-t használtunk. Az SSiASC sejtekből való RNS izolálás menete a fent leírtaknak megfelelően történt.) A tumorminták reprezentatív FFPE blokkjaiból 5 darab, 15 µm vastagságú metszetet készítettünk 1,5 ml-es sterilezett Eppendorf csövekbe. A xilolos és etanolos deparaffinálást követően RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit-tel (Ambion by Thermo Fisher Scientific) végeztük el a nukleinsavak izolálását a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS kinyerésekor minden munkafolyamat során figyeltünk a steril/RNáz-mentes körülmények biztosítására, valamint beiktattunk DNáz kezelést is, mint a kit-ek opcionális lépését a reziduális DNS eltávolítására. A nukleinsavak koncentrációját NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Houston, USA) spektrofotométer segítségével mértük le 260 nm hullámhosszon. A DNS mintát -20 °C-on, az RNS mintákat -80 °C-on tároltuk további kísérleteinkig.

3.9. Az SS-iASC sejtvonal hitelesítése STR analízissel

Az SS-iASC sejtekből izolált DNS-ből 40 µg-ot küldtünk el rövid, tandem ismétlődő szekvencia (STR, short tandem repeat) analízisre a dániai IdentiCell Service részére (www.identicell.eu, Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Dánia). A cég 9 STR lókuszt, valamint az amelogenin gént vizsgálja (utóbbit a nemi azonosításhoz) és a kapott úgynevezett „DNS ujjlenyomatot” összeveti a Német Mikroorganizmus és Sejtkultúra Gyűjteményével (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). A vizsgált lókuszok részletesen a 4. táblázatban láthatók.

4. Táblázat: A vizsgált STR lókuszok

Gén/ STR marker	Érintett gén neve/ kromoszóma régió
AMEL	amelogenin X, Xp22.2 amelogenin Y, Yp11.2
CSF1PO	humán c-fms protoonkogén 6. intronja, 5q33.1
D13S317	13q31.1
D16S539	16q24.1
D21S11	21q21.1
D5S818	5q23.2
D7S820	7q21.11
TH01	humán tirozin-hidroxiláz gén 1. intronja, 11p15.5
TPOX	humán thyroid peroxidáz gén 10. intronja, 2p25.3
vWA	von Willebrand faktor 40. intronja, 12p13.31

3.10. Reverz transzkripció (RT)

A sejtekből, a vérmintákból és a SS tumorok FFPE mintáiból kinyert RNS cDNS-sé történő átírása kétféle kit felhasználásával történt. A miR-206 célgének génexpressziójának meghatározásához, valamint a vérmintákból és a SS tumorok FFPE mintáiból származó RNS-ének átírásához a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et használtuk (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) a gyártó ajánlása alapján. 20 µl végtérfogatban 500-1000 ng RNS konverzióját hajtottuk végre. A reverz transzkripciós reakció összetétele a 5. táblázatban olvasható.

5. Táblázat: A reverz transzkripciós mix összetétele

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

A cDNS szintézis a Veriti® 96-Well Thermal Cycler PCR készülékben (Thermo Fisher Scientific) zajlott a 6. táblázatban leírt beállításoknak megfelelően.

6. Táblázat: A reverz transzkripció beállításai

Folyamat	Időtartam	Hőmérséklet
Inkubáció	10 perc	25 °C
Reverz transzkripció	120 perc	37 °C
Inaktiváció	5 perc	85 °C

A miRNS expressziós vizsgálatok esetén a cDNS szintézist a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. Ezen reakcióknál a TaqMan® Small RNA Assay-k (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) miRNS specifikus primereivel dolgoztunk. 15 µl végtérfogatban 10 ng RNS minta került átírásra, mely 11 µl master mix-et és 3 µl, a vizsgálni kívánt miRNS-re specifikus RT primert tartalmazott az RNS minta mellett. A master mix összetétele az 7. táblázatban található.

7. Táblázat: A miRNS specifikus reverz transzkripciós mix összetétele

Komponens	Bemérés
RT puffer (10X)	1,5 µl
dNTP mix (100mM)	0,15 µl
RNáz inhibitor (20U/µl)	0,19 µl
Reverz transzkriptáz (50U/µl)	1 µl
Nukleáz mentes víz	8,16 µl

Az összetevők elegyítését követően a mintát 5 percig jégen tartottuk, majd ugyanúgy Veriti® 96-Well Thermal Cycler PCR készülékben (Thermo Fisher Scientific) zajlott a reverz transzkripció a 8. táblázatban leírt beállításoknak megfelelően. A két módon átírt cDNS mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

8. Táblázat: A miRNS specifikus reverz transzkripció beállításai

Folyamat	Időtartam	Hőmérséklet
Reverz transzkripció	30 perc	16 °C
	30 perc	42 °C
Inaktiváció	5 perc	85 °C

3.11. Valós-idejű kvantitatív PCR (q-RT-PCR)

A sejtvonalak miRNS expressziójának és a miR-206 target gének mRNS expressziójának meghatározásához valós-idejű kvantitatív PCR (real time, q-RT-PCR) vizsgálatokat végeztünk TaqMan® alapú (Thermo Fisher Scientific) expressziós rendszerek segítségével. A q-RT-PCR módszere célszekvenciák mennyiségi analízisére alkalmas vizsgálat. A reakciókhoz a korábban izolált RNS-t átírtuk cDNS-sé, majd specifikus oligonukleotid próbákat, úgynevezett TaqMan® próbákat használtunk a relatív termékmennyiség meghatározására.

A miR-206 expresszió szintjét a miR-206-tal és az üres vektorral transzfektált, illetve nem transzfektált sejtekben vizsgáltuk a hsa-miR-206 assay (assay ID 000510) segítségével. Belső kontrollként az RNU6B-t (assay ID 0010093, PN 4427975), kalibrátornak pedig az üres vektorral transzfektált és a nem transzfektált sejteket használtuk. A PCR amplifikáció 40 cikluson át 20 µl végtérfogatban zajlott. A cDNS templát a miRNS specifikus reverz transzkripciós reakciókból származott. A LightCycler® 480 II. (Roche Applied Science) típusú valós idejű PCR készülékben zajló reakció összetétele a 9. táblázatban, hőprofilja pedig a 10. táblázatban látható. Az utóbb említett hőprofil két-lépéses PCR-nek felel meg, ahol az anelláció és az elongáció ugyanazon a hőmérsékleten játszódik le.

9. Táblázat: A TaqMan miRNS expressziós q-RT-PCR reakciók összetétele

Komponens	Bemérés
TaqMan Master mix (2X)	10 µl
TaqMan small RNA assay (20X)	1 µl
Nukleáz mentes víz	7,67 µl
cDNS	1,33 µl

10. Táblázat: A TaqMan q-RT-PCR reakció hőprofilja

Folyamat	Időtartam	Hőmérséklet	Ciklusszám
Aktiváció	2 perc	50 °C	1
Denaturáció	10 perc	95 °C	1
	15 másodperc	95 °C	40
Anelláció-Elongáció	1 perc	60 °C	

A kiválasztott miR-206 célgének expresszióját a miR-206-tal és az üres vektorral transzfektált, illetve a nem transzfektált sejtekben vizsgáltuk a *SMARCB1* (assay ID: Hs00992522_m1), *ACTL6A* (assay ID: Hs00895061_m1), *CCND1* (assay ID: Hs00765553_m1), *POLA1* (assay ID: Hs00415835_m1), *NOTCH3* (assay ID: Hs01128537_m1), *SNAI1* (assay ID: Hs00195591_m1), *MET* (assay ID: Hs01565576_m1) és *G6PD* (assay ID: Hs00166169_m1) TaqMan® assay-k segítségével. A miR-206 célgének kiválasztása korábbi munkáink eredményein, illetve szakirodalmi adatokon alapult. Belső kontrollnak *GAPDH*-t (part no.: 4352338E) alkalmaztunk, kalibrátornak pedig az üres vektorral transzfektált és a nem transzfektált sejteket használtuk. A miR inhibíciós kísérletek során ugyanezen miRNS expressziós és génexpressziós assay-ket, valamint az inhibíció sikerességének ellenőrzésére a *HMGA2* (assay ID: Hs00171569_m1) TaqMan® assay-t használtuk. Az SS-iASC sejtvonalban az *SS18-SSX1* fúziós transzkriptum kimutatására SS18-SSX1+ (assay ID: Hs03024820_ft) TaqMan® assay-t, belső kontrollnak *ABL1* (assay ID: Hs01104728_m1) TaqMan® assay-t alkalmaztunk. 50 ng cDNS templát bemérését követően 20 µl végtérfogatban zajlottak a reakciók. A reakcióelegyek összetétele a 11. táblázatban látható. A PCR hőprofilja a 10. táblázattal megegyező volt.

11. Táblázat: A TaqMan génexpressziós q-RT-PCR reakciók összetétele

Komponens	Bemérés
TaqMan Master mix (2X)	10 µl
TaqMan gene expression Assay (20X)	1 µl
Nukleáz mentes víz	8 µl
cDNS	1 µl

Minden q-RT-PCR esetén 3 párhuzamos reakció futott egyidőben. Az eredményeket C_p értékek formájában nyertük. A C_p („crossing point" vagy másik megfelelője C_T néven ismert „cycle threshold") azt a ciklusszámot jelöli a reakció exponenciális fázisában, ahol a relatív fluoreszcenciaszint eléri a beállított küszöbértéket. A relatív expressziós szintek kiszámítása a $\Delta\Delta C_p$ módszer segítségével történt (124).

3.12. SS18-SSX1 és SS18-SSX2 fúziós gének detektálása nested PCR-rel

Kísérleteink során synovialis sarcomás betegek véréből szerettük volna kimutatni az *SS18-SSX1* vagy az *SS18-SSX2* fúziós transzkriptumot. Ehhez először nested PCR módszert alkalmaztunk. A nested PCR annyiban különbözik a hagyományos PCR-től, hogy a reakciót nem egy, hanem két körben végezzük el két primer pár segítségével, mindezzel csökkentve az aspecifikus PCR termékek kialakulását.

A fúziós gének PCR amplifikációja során a nested PCR reakciókat kis módosításokkal Hashimoto és munkatársai tanulmánya alapján (119) tervezett két primer párral hajtottuk végre. Az első körben a külső primer párok, valamint a vizsgálni kívánt cDNS minták (vérminták, SS-iASC sejtvonal, két SS FFPE tumorszövet) felhasználásával zajlott le a reakció, majd a második körben a belső primer párokkal és az előző reakció 'külső' PCR termékeivel dolgoztunk. A második körben alkalmazott belső primer párok mind az *SS18-SSX1*, mind az *SS18-SSX2* fúziós gének amplifikációjára alkalmasak. A külső és a belső primer párok szekvenciája a 12. táblázatban található.

12.Táblázat: Az *SS18-SSX1* és *SS18-SSX2* nested PCR során használt primer párok

	Forward	Reverz	Amplikonhossz
Külső primerek	5'caacagcaagatgcatacca3'	5'cacttgctatgcacctgatg3'	548 bp
Belső primerek	5'acagcctggaccaccacagc3'	5'aggcatgtttccccttttg3'	212 bp

A PCR reakciók mindkét körben 20 µl végtérfogatban mentek végbe Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) felhasználásával. Az első körben egy reakcióba 25 ng cDNS került. Belső kontrollnak *GAPDH*-t alkalmaztunk. A reakcióelegy pontos összetétele a 13. táblázatban olvasható. Az amplifikáció Veriti® 96-Well Thermal Cycler PCR készülékben (Thermo Fisher Scientific) zajlott 30 cikluson keresztül a 14. táblázatban szereplő hőprofilnak megfelelően. A PCR termékek tárolása a további kísérleteinkig 4 °C-on történt.

13. Táblázat: A nested PCR reakciók összetétele

Komponens	Bemérés
Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix (2X)	10 µl
Forward primer out/in (10 µM)	1 µl
Reverz primer out/in (10 µM)	1 µl
Nukleáz mentes víz	6 µl
cDNS/külső PCR termék	2 µl

14. Táblázat: A nested PCR hőprofilja

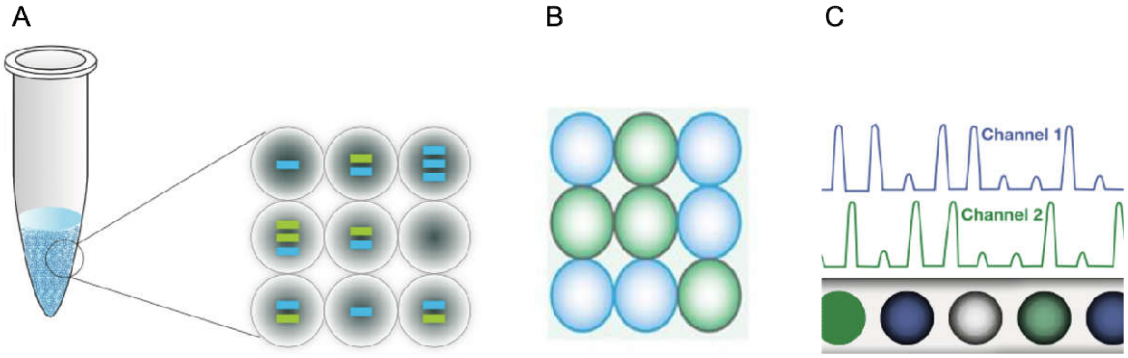
Folyamat	Időtartam	Hőmérséklet	Ciklusszám
Denaturáció	10 perc	95 °C	1
	20 másodperc	95 °C	30
Anelláció	20 másodperc	58 °C	
Elongáció	30 másodperc	72 °C	
Végső elongáció	5 perc	72 °C	1

Miután megtörtént a kétkörös PCR amplifikáció, a PCR termékek hosszának ellenőrzése agaróz-gélelektroforézissel történt 2 vegyes %-os (v%) agarózgélben (2 g agaróz, 100 ml 1x TAE puffer), ethidium-bromid (1 µg/ml) jelöléssel. Futtató pufferként 1x TAE oldatot használtunk. A 100V feszültségen 30 percen át zajló elektroforézist követően a migrációs mintázatot UV fényben detektáltuk Kodak Image Station 4000MM (Kodak, Rochester, NY, USA) géldokumentációs rendszer segítségével.

3.13. Droplet Digitális PCR (ddPCR)

Az *SS18-SSX1* és *SS18-SSX2* fúziós gének nagy érzékenységű kimutatásához droplet digitális PCR (ddPCR) módszert is alkalmaztunk.

A hagyományos polimeráz láncreakció egyik hátránya a szemikvantitativitás, ugyanis a PCR termék detektálása agaróz-gélelektroforézissel történik. A q-RT-PCR fluoreszcencián alapuló detektálást használ a felhalmozódó PCR termékek mennyiségének mérése céljából. A q-RT-PCR-nél szükség van a belső kontrollgénekre történő normalizálásra, ami így csak relatív mennyiségi meghatározást tesz lehetővé. Ezekkel szemben az egyre inkább teret hódító digitális PCR (dPCR) ötvözve a hagyományos PCR amplifikációt és a q-RT-PCR esetén alkalmazott fluoreszcens detektálást egy precíz, magasabb szenzitivitású abszolút mennyiségi meghatározást tesz lehetővé. A digitális PCR ötletét Vogelstein és Kinzler írták le 1999-ben (125). A koncepció lényege, hogy a mintát hígítva szétosztották, így egy 96-mintahelyes lemez (plate) egy reakcióterébe csak egy templát DNS molekula került. Ezzel a templát DNS önállóan, külön reakciótérben amplifikálódott. A termékeket ezután fluoreszcens próbákkal detektálták. A reakcióterek létrehozása még az amplifikáció előtt történik a dropletképzés során. A reakcióelegy összemérése a q-RT-PCR-hez hasonló, majd egy dropletképző automata előállítja a dropleteket, melyekbe összesen egy vagy néhány templát nukleinsav kerül. Ezután következik az amplifikáció, mely olaj-víz emulzióban zajlik. Az amplifikációt a leolvasás követi. Ekkor a fluoreszcens próbák felhasználásával azonosíthatók a felsokszorosított célszekvenciák, ezáltal minden egyes reakciótérben meghatározható, hogy jelen van-e és ha igen, milyen mennyiségben a vizsgálni kívánt szekvencia (10. ábra).



10. Ábra: A BioRad ddPCR rendszer sematikus működése. A PCR reakciók összemérése után a mintákat a droplet generátorral dropletekre osztjuk. A dropletekben lévő zöld csíkok a vizsgálni kívánt szekvenciát, míg a kékek a további DNS részeket jelölik (A). PCR amplifikáció (B). A PCR amplifikáció után a dropletek leolvasásra kerülnek (C). (www.bio-rad.com)

A nested PCR kísérleteinkhez hasonlóan a 15 vérmintából származó cDNS-t, illetve pozitív kontrollként az SS-iASC sejtvonalból származó, valamint a két SS FFPE tumorból származó cDNS-t használtuk templátként a fúziós transzkriptumok kimutatásához. A ddPCR reakciók 22 µl végtérfogatban zajlottak a ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (katalógusszám: 1863024, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) illetve az SS18-SSX1+ (assay ID: Hs03024820_ft) és az SS18-SSX2+ (assay ID: Hs03024398_ft) TaqMan® assay-k (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), valamint a QX200 ddPCR rendszer (Bio-Rad) felhasználásával, követve a gyártó utasításait. A reakcióelegyek reakciócsövekbe való szétosztását követően 50 ng/µl cDNS minta került bemérésre egy csőbe. Ezt követően a plate-eket a PX1™ PCR Plate Sealer segítségével fóliáztuk le, majd a mintákat egyenlő méretű és térfogatú dropletekbe osztottuk a QX200 Droplet Generator segítségével (Bio-Rad). Ezután a C1000 Touch™ Thermal Cyclerben (Bio-Rad) zajlott az amplifikáció. A PCR után a dropletek a QX200 Droplet Readerben (Bio-Rad) kerültek egyesével leolvasásra, mely megszámolta a fluoreszcens pozitív és negatív dropleteket. A leolvasás után a QuantaSoft™ (Bio-Rad) szoftver a Poisson algoritmus segítségével kiszámolta a vizsgálni kívánt RNS kópiaszámát, illetve koncentrációját. Kísérleteinkben a pozitivitás határértékét a 3-nál több pozitív droplet detektálása jelentette, mivel a negatív kontroll minták esetén is kimutatható volt 1-2 pozitív esemény. Negatív kontrollként az iASC, Caco2 és HT-1080 sejtvonalakból származó cDNS mintákat használtuk. A

reakcióelegyek összetétele a 15. táblázatban, a ddPCR reakció hőprofilja a 16. táblázatban olvasható.

15. Táblázat: A ddPCR reakcióelegy összetétele

Komponens	Bemérés
ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (2X)	11 µl
TaqMan gene expression Assay (20X)	1 µl
Nukleáz mentes víz	9,5 µl
cDNS	0,5 µl

16. Táblázat: A ddPCR hőprofilja

Folyamat	Időtartam	Hőmérséklet	Ciklusszám
Aktiváció	10 perc	95 °C	1
Denaturáció	30 másodperc	94 °C	40
Anelláció	1 perc	55 °C	
Inaktiváció	10 perc	98 °C	1

3.14. Fehérje izolálás sejtekből

A fehérje izoláláshoz az SS-iASC, SS-iASC-206, SS-iASC-üres, iASC, iASC-206, iASC-üres, Caco2, Caco2-206, Caco2-üres, HT-1080, HT-1080-206 és HT-1080-üres sejteket 75 cm²-es sejttenyésztő flaskákban tenyésztettük. A médium leöntése után a sejteket 3x10 ml 1x-es PBS-sel mostuk. Ezután közvetlenül a sejtekre 1 ml lízis puffert mértünk (20 mM Tris pH=7,5, 2mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% TritonX100, 0,5% proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich), 2 mM Na_3VO_4, 10 mM NaF) és sejtkaparó segítségével összeszedtük, majd 2 ml-es Eppendorf csőbe tettük őket. A mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 2x10 másodpercig szonikáltuk. Ezután 13000 rpm-mel, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk őket. Ezt követően a minták felülúszóinak fehérje-koncentrációját meghatároztuk a Bradford módszer alapján (126) az Ultrospec-2000 UV/Vis spektrofotométerrel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, CA, USA). A fehérjemintákat további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.15. Western blot

A sejtekből származó fehérjemintákból 30 µg-ot összekevertünk β-merkaptoetanolt tartalmazó Laemli-féle mintapufferrel, ezt követően 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd standard 10%-os poliakrilamid gélek zsebeibe töltöttük őket. Az elektroforézis 200V konstans áramerősség mellett 40 percig tartott Bio-Rad Mini Protean vertikális elektroforézis rendszeren (Bio-Rad).

A fehérjeminták Millipore PVDF membránra való blottolása 75mA áramerősség mellett egy teljes északán át 4 °C-on zajlott. Ezt követően a blottolás hatékonyságát Ponceau-festéssel ellenőriztük. Az aspecifikus antitestkötődést 5 w/v%-os TBS-ben oldott tejporral (Bio-Rad) küszöböltük ki, a membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten az oldattal. Ezután a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on a megfelelő elsődleges antitesttel. A következő lépésben TBST-vel mostuk a membránokat, majd a megfelelő másodlagos antitesttel inkubáltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A másodlagos antitesttel való inkubációt TBST-s mosás követte, majd a tormaperoxidáz enzim szubsztrátjaként SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kitet (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A

membránok kemilumineszcens jeleit Kodak Image Station 4000MM (Kodak, Rochester, NY, USA) rendszer segítségével tettük láthatóvá és értékeltük.

3.16. Immuncitokémia

Az SS-iASC sejtek karakterizálása részben immuncitokémiai reakciókkal történt. Ehhez 25 cm²-es sejttenyésztő flaskákban SS-iASC és iASC sejteket tenyésztettünk, majd a médium leöntését és 1x-es PBS-sel való mosást követően tripszin-EDTA segítségével felszedtük őket a flaskák felszínéről. Az SS-iASC és iASC sejteket citospin segítségével üveg tárgylemezre centrifugáltuk, szárítottuk, majd -20 °C-os metanollal fixáltuk. Az így előkészített SS-iASC sejteket Bond Max™ (Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság) típusú immunfestő automatával festettük a 17. táblázatban felsorolt primer antitestekkel. A fixált sejteket 25 percig inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal, majd az immunreakciót a H_2O_2/DAB szubsztrát/chromogén kit (Leica Biosystems) segítségével hívtuk elő. Záró lépésként a sejtmagokat hematoxilinnel festettük.

A miR transzfekciót követően az SS-iASC, SS-iASC-206, SS-iASC-üres, iASC, iASC-206, iASC-üres, Caco2, Caco2-206, Caco2-üres, HT-1080, HT-1080-206 és HT-1080-üres sejtek immuncitokémiai reakcióihoz 6-lyukú szövettenyésztő edény 1 reakcióterébe $4x10^5$ db sejtet 22 x 22 mm-es steril üveg fedőlemezre növesztettünk. A szélesztést követő 24-48 órával a sejteket 1x-es PBS-es mosás után -20 °C-os metanollal fixáltuk 10 percig, majd szárítottuk. Az így előkészített mintáinkat a fixálás után és az egyes lépések között is 1x-es PBS-sel mostuk (3 x 5 perc). A reakciókat a Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Egyesült Királyság) kit segítségével végeztük manuálisan, a gyártó utasításainak megfelelően. Az 5 perces peroxidáz blokkot szintén 5 perces protein blokk követte (mindkét reagens a kit része), majd a mintákat az egérben termeltetett anti-BAF47 (SMARCB1) elsődleges ellenanyaggal (klón 25, hígítás: 1:50, BD Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA) inkubáltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Ezután 30-30 percen át Post Primary és Polymer oldatos (mindkét reagens a kit része) inkubáció következett, végül az immunreakciót a kit részét képező H_2O_2/DAB szubsztrát/chromogén oldatokkal hívtuk elő 5 perces inkubáció során. Záró lépésként a sejtmagokat hematoxilinnel festettük. Az immunreakciókat a SMARCB1 festődés sejtmagi jelenléte, hiánya, esetleges intenzitás csökkenése alapján értékeltük.

Az SS-iASC sejtekben lévő HA-jelölt SS18-SSX1 sejtmagi fehérje kimutatásához az SS-iASC sejteket és negatív kontrollként az iASC sejteket a fentiekben leírt módon fedőlemezre szélesztettük, fixáltuk, majd az aspecifikus kötődést 5 w/v%-os BSA(PBS) oldattal blokkoltuk 30 percig, szobahőmérsékleten. Az elsődleges antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a mintákat, majd az Alexa Fluor® 568-cal konjugált másodlagos ellenanyaggal (ld. 17. táblázat) inkubáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. Végezetül a sejtmagokat DAPI-val festettük (Vector Laboratories). Az immunfluoreszcens reakciók kiértékelése, valamint a fotók készítése Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkóppal, VDS Vosskühler CCD-1300 monokróm kamerával és LUCIA™ Citogenetics 1.5.6 szoftverrel történt. Az egyes lépések között a sejteket 1x-es PBS-sel mostuk (3 x 5 perc).

3.17. Áramlás citometria

Az áramlás citometriás kísérletekhez iASC, iASC-206, SS-iASC, SS-iASC-206, Caco2 és Caco2-206 sejteket tenyésztettünk 25 cm²-es sejttenyésztő flaskákban. A médium leöntése után a sejteket 1x-es PBS-sel mostuk, majd tripszin-EDTA segítségével felszedtük a flaskák felszínéről. A reakciót az adott sejtvonalnak megfelelő médiummal állítottuk le. Egy citocentrifuga csőbe $5x10^5$ db sejtet tartalmazó sejtszuszpenzió került. A sejteket először 400 g-n 5 percen át centrifugáltuk, majd az IntraStain kit (Dako-Agilent, CA, USA) segítségével fixáltuk és permeabilizáltuk. Az így előkészített mintákat a fixálás után és az azt követő lépések között is 1x-es PBS-sel centrifugáltuk (400 g, 5 perc). Ezt követően a sejteket az egérben termeltetett anti-BAF47 (SMARCB1) elsődleges ellenanyaggal (klón 25, hígítás: 1:50, BD Transduction Laboratories) inkubáltuk 20 percen keresztül, szobahőmérsékleten. Ezután a sejteket kecskében termeltetett Alexa Flour® 647 anti-egér IgG (H+L) másodlagos antitesttel (ld. 17. táblázat) inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben, 20 percig. Végül a FACSCalibur flow-citométer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) segítségével mintánként $2x10^4$ db jelölt sejtet vizsgáltunk és az adatokat a FlowJo (v10) (Ashland, OR, USA) program segítségével elemeztük. A szoftver segítségével az élő sejtek átlag fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg.

17. Táblázat: A kísérletekhez használt antitestek és hígításaik

[1] Western blot; [2] Immuncitokémia; [3] Immunhisztokémia; [4] Immunfluoreszcencia; * Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; BioLegend, San Diego, CA, USA; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA; Novocastra, Leica Biosystems Newcastle, Newcastle, Egyesült Királyság; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA ; BD Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA; Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

Elsődleges antitest	Faj	Gyártó*	Klón/Kat.szám	Hígítás WB[1]	Hígítás ICC[2]/IHC[3]
Anti-BAF47 (SMARCB1)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	clone D9C2	1:1000	-
Anti-HA.11 Epitope Tag	Egér monoklonális	BioLegend	clone 16B12	1:2000	1:1000
β-Actin	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	4967	1:1000	-
Anti-human cytokeratin	Egér monoklonális	DakoCytomation	clones AE1/AE3	-	1:150
Anti-human β-catenin	Egér monoklonális	Novocastra	clone 17C2	-	1:100
Anti-human TLE1	Nyúl poliklonális	Santa Cruz Biotechnology	clone M-101	-	1:50
Anti-human vimentin	Egér monoklonális	DakoCytomation	clone V9	-	1:1200
Anti-human EMA	Egér monoklonális	DakoCytomation	clone E29	-	1:200
Anti-human Bcl2	Egér monoklonális	DakoCytomation	clone 124	-	1:40
Anti-human CD117	Nyúl poliklonális	DakoCytomation	clone A4502	-	1:2000
Anti-human cyclin D1	Nyúl monoklonális	Thermo Fisher	clone SP4	-	1:50
Anti-human SYT	Egér monoklonális	Santa Cruz Biotechnology	clone A-10	-	1:100
Anti-BAF47 (SMARCB1/INI1)	Egér monoklonális	BD	clone 25	-	1:50
Másodlagos antitest	**Faj**	**Gyártó***	**Kat.szám**	**Hígítás WB[1]**	**Hígítás IF[4]**
Anti-egér Ig/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P0447	1:2000	-
Anti-nyúl Ig/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P0448	1:2000	-
Alexa Fluor® 568 anti-egér IgG (H+L)	Kecske poliklonális	Invitrogen by Thermo Fisher	A1104	-	1:200
Alexa Fluor® 647 anti-egér IgG (H+L)	Kecske poliklonális	Invitrogen by Thermo Fisher	A-21235	-	1:500

3.18. Statisztikai analízis

A relatív génexpressziós változások szignifikanciájának meghatározásához non-parametrikus egymintás Wilcoxon tesztet használtunk. Mintáink kis száma miatt nem tudtunk normál eloszlással számolni, ezért a parametrikus egymintás t-próba nem jöhetett szóba. Azokat a különbségeket fogadtuk el szignifikánsnak, amelyeknél a p érték kisebb volt 0,05-nél. A statisztikai vizsgálatokat Real Statistics Excel add-in Resource Pack (www.real-statistics.com) felhasználásával végeztük.

3.19. Mintavételi szempontok a synovialis sarcomával diagnosztizált betegeknél

A Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében 2009-2015 között synoviális sarcomával diagnosztizált betegekből 15 pácienst választottunk ki vizsgálatainkhoz. A synovialis sarcoma szövettani és molekuláris diagnózisa a jellegzetes szövettani kép és immunhisztokémiai reakciók (cytokeratin, EMA, Bcl2, TLE-1, SYT, β-Catenin, vimentin, cyclin D1, CD117, SMARCB1) alapján, valamint magára a tumorra specifikus *SS18-SSX1* vagy *SS18-SSX2* fúziós gén FISH-sel való kimutatásával történt. A FISH vizsgálatok során a már említett Vysis SS18 Break Apart Probe (Vysis) és az SS18/SSX1 TRICHECK™ Probe (ZytoVision) DNS próbákat használtuk. A betegek klinikai adatait a Semmelweis Egyetem betegnyilvántartási adatbázisából, a kezelési protokollokat pedig a Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Onkológiai Osztályának segítségével retrospektív módon gyűjtöttük össze (ld. 19. táblázat). A kiválasztott 15 beteg a mintavételt megelőzően beleegyező nyilatkozatot írt alá, amelyben hozzájárultak a tumormintáik, vérmintáik és klinikai adataik kutatásban való felhasználásához. A vizsgálatokat a Helsinki Deklaráció követelményeinek megfelelően, a Semmelweis Egyetem Regionális Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztük el (etikai engedély száma: TUKEB 155/2012).

4. EREDMÉNYEK

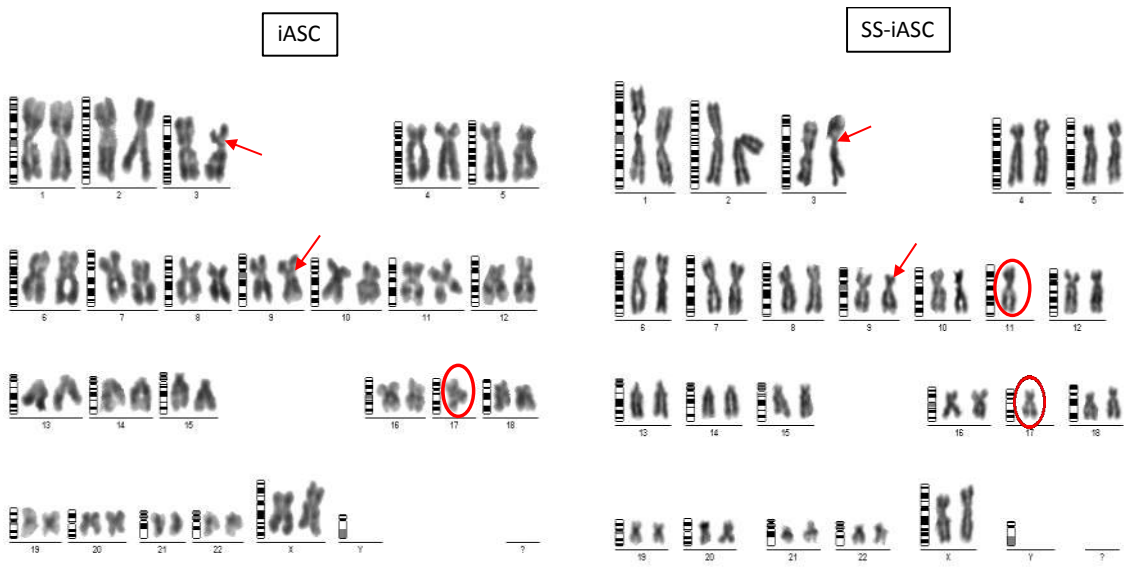
4.1. Az SS-iASC sejtvonal vizsgálata

4.1.1. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

Két FISH próba segítségével kíséreltük meg kimutatni az *SS18-SSX1* fúziós gént az SS-iASC sejtekben. FISH vizsgálatokkal nem tudtunk kimutatni transzlokációt a Vysis SS18 Break Apart FISH próbával, sem transzlokációt és kolokalizációt az SS18/SSX1 TRICHECK™ próbával az SS-iASC sejtekben.

4.1.2. Az SS-iASC és iASC sejtvonalak kariotipizálása

A 11. ábrán az iASC és SS-iASC sejtek kariogramjai láthatók. Mindkét sejtvonalban a sejtek döntő részében a 3-as és 9-es kromoszóma derivációja, illetve 17-es monoszómia volt megfigyelhető. Ezeken kívül néhány sejtben további random monoszómiát láttunk a 3-as, 4-es, 8-as, 11-es, 14-es, 16-os, 18-as, 19-es, 20-as, 21-es és X kromoszómák tekintetében.



11. Ábra: Az iASC és SS-iASC sejtvonalak kariogramjai. Piros kör: monoszómia; piros nyíl: deriváció.

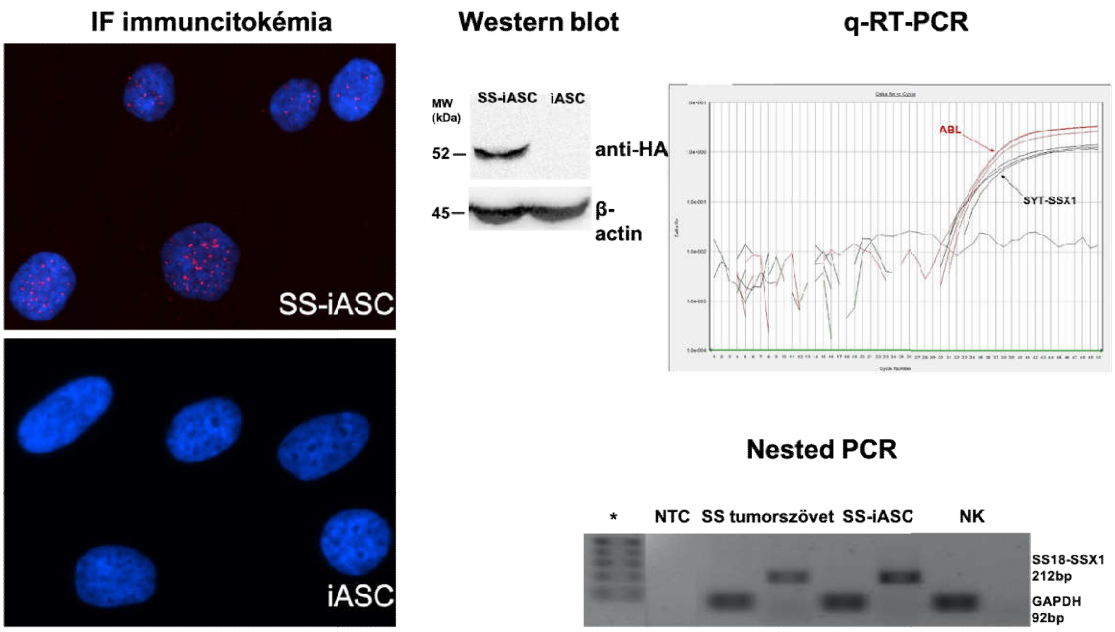
4.1.3. Az SS-iASC sejtvonal STR analízise

A dániai IdentiCell Service által elvégzett rövid, tandem ismétlődő szekvencia analízis igazolta az SS-iASC sejtvonal humán női eredetét, ugyanis X kromoszómához kötött amelogenin gént detektált, illetve összevetve a Német Mikroorganizmus és Sejtkultúra Gyűjteménnyel (DSMZ) kizárta annak a lehetőségét, hogy a sejtvonal kontaminálódott volna bármilyen egyéb sejtvonallal.

4.1.4. A kimérikus SS18-SSX1gén kifejeződése mRNS és fehérje szinten

Ahhoz, hogy bizonyítsuk az SS-iASC sejtvonalban az *SS18-SSX1* kimérikus gén mRNS szintű kifejeződését q-RT-PCR és nested PCR reakciókat végeztünk a sejtekből származó reverz transzkripcióval átírt cDNS-sel. Mind a valós idejű polimeráz láncreakcióval, mind a nested PCR-rel ki tudtuk mutatni az *SS18-SSX1* fúziós transzkriptum expresszióját (12. ábra). A kimérikus gén mRNS szintű expressziója mellett fehérje szintű kifejeződését is szerettük volna alátámasztani. Az SS-iASC sejtekbe transzdukált vektort a fúziós gén és a fluoreszcens riporter mellett

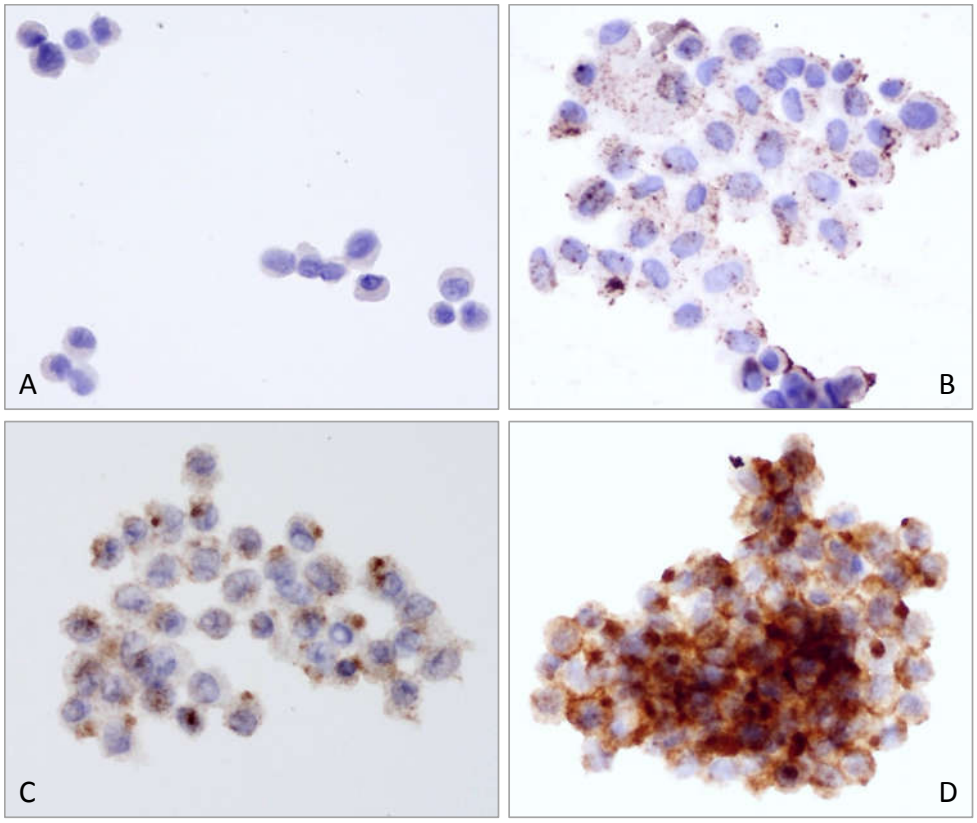
influenzavírus haemagglutininnel (HA) is kiegészítették, így immunfluoreszcens jelöléssel és Western blottal is megvizsgáltuk a HA-jelölt *SS18-SSX1* kimérikus géntermékét. Az SS-iASC sejtmagokban változó mennyiségben lehetett megfigyelni HA immunjelölést, míg a negatív kontroll iASC sejtek magjaiban nem volt látható jelölődés (12. ábra). Western blottal az SS-iASC sejtvonal stabilan, míg az iASC nem fejezte ki a HA-jelölt fúziós fehérjét (12. ábra).



12. Ábra: Az *SS18-SSX1* fúziós géntermék kimutatása mRNS és fehérje szinten. A HA-jelölt SS18-SSX1 fehérje detektálása immunfluoreszcens festéssel: a piros pontok jelzik az SS-iASC sejtek magjában kifejeződő fúziós fehérjét, míg az iASC sejtek magjában nem látható jelölődés. A HA-jelölt fúziós gén detektálása Western blottal: az SS-iASC sejtvonalban jól látható a HA-jelölt fehérje expresszió (52 kDa), míg az azt nem expresszáló iASC nem fejezi ki a fehérjét. A belső kontrollnak használt β-Actin mindkét sejtvonalban kifejeződik (45 kDa). A q-RT-PCR amplifikációs görbéi: az SS18-SSX1 fekete színnel, a belső kontroll *ABL* gén piros színnel jelzett az SS-iASC sejtvonalban. A nested PCR-t követő migrációs mintázat: a pozitív kontroll SS tumorszövetben és az SS-iASC sejtvonalban látható az *SS18-SSX1* fúziós transzkriptum (212 bp). A belső kontroll *GAPDH* (92bp) mind a SS tumorszövetben, mind az SS-iASC sejtekben és a negatív kontroll (NK) iASC sejtvonalban egyaránt kifejeződik. A nem templált kontrollban (NTC) sem az *SS18-SSX1*, sem a *GAPDH* nem expresszálódott.

4.1.5. Az iASC és SS-iASC sejtek immuncitokémiai jellemzői

Az iASC sejtek esetén a cytokeratin negatív festődést, míg a β-catenin gyenge citoplazmatikus pozitivitást mutatott (13/a és 13/c ábra). A fúziós gént kifejező SS-iASC sejtek fokális citoplazmatikus cytokeratin pozitivitást (13/b ábra), valamint az iASC sejteknél erősebb citoplazmatikus β-catenin reakciót mutattak (13/d ábra). Egyik sejtben sem láttunk magi TLE-, SYT (SS18) vagy cyclin D1 festődést. A SMARCB1 (INI1) magi pozitivitás egyformán erős volt mindkét sejtvonalban. A vimentin mindkét sejtvonalban erősen pozitív volt, míg a Bcl2, EMA és CD117 negatívnak bizonyultak.



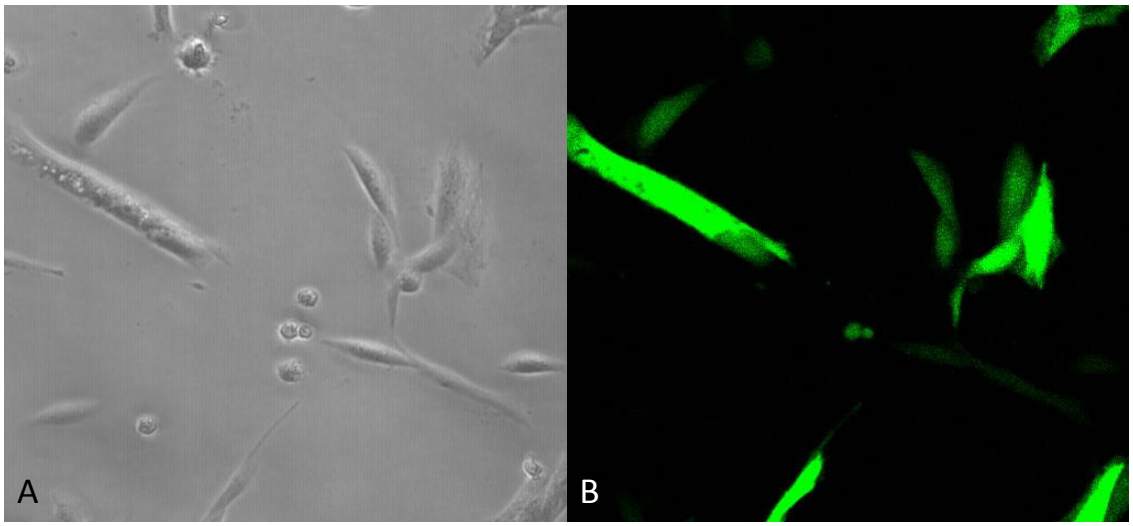
13. Ábra: Az iASC sejtek cytokeratinnal nem jelölődnek (A; 40 x nagyítás), de az SS-iASC sejtek fokális pozitivitást mutatnak (B; 40 x nagyítás). Az iASC sejtekben enyhe citoplazmatikus β-catenin pozitivitás (C; 40 x nagyítás), míg az SS-iASC sejtekben erősebb festődés látható (D; 40 x nagyítás).

4.2. A permanens miR-206 transzfekció hatásának funkcionális vizsgálata sejttenyészetekben

4.2.1. A permanens miR-206 transzfekció hatásosságának ellenőrzése és a miR-206 expresszió relatív szintjének meghatározása

A miR-206 és az üres vektor permanens transzfekciója után 24 órával fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük a transzfekció hatékonyságát a tíz sejtvonalban (iASC206, iASC-üres, SS-iASC-206, SS-iASC-üres, Caco2-206, Caco2-üres, HT-1080-206, HT-1080-üres, HDFα-206, HDFα-üres). Minden sejtvonal esetén a sejtek 75-80%-ában figyeltünk meg GFP kifejeződést (14. ábra). Az azt követő Geneticin® antibiotikumos kezelés alatt egyedül a HDFα-206 sejtek mutattak lassabb növekedést a többi sejthez képest, majd az antibiotikus kezelés felfüggesztését követő egy hónapon belül elpusztultak.

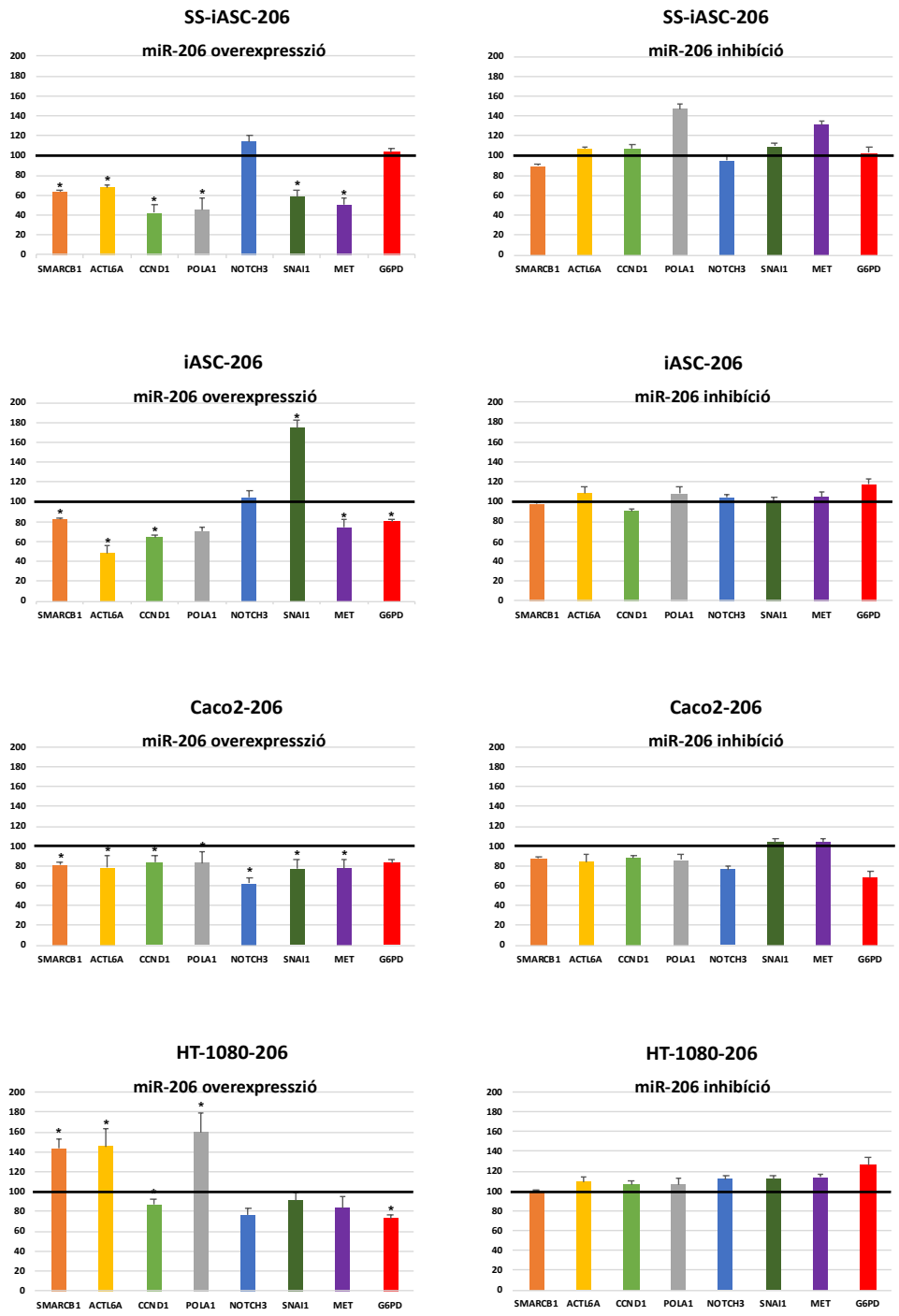
A szelekció után minden miR-206-tal transzfektált sejtvonal overexpresszálta a miR-206-ot. Az SS-iASC-206 sejtekben 138-szoros, az iASC-206 sejtekben 1493-szoros, a Caco2-206 sejtekben 222-szeres és a HT-1080-206 sejtekben 360-szoros volt a miR-206 relatív expressziója a nem transzfektált és üres vektorral transzfektált kontrollokhoz képest.



14. Ábra: Az SS-iASC-206 sejtek képe 24 órával a transzfekciót követően fáziskontraszt mikroszkóp (A) és fluoreszcens mikroszkóp (B) alatt. A GFP (green fluorescent protein) a transzfektált sejtek 75-80 %-ában megfigyelhető volt.

4.2.2. A miR-206 célgének relatív expressziója és azok változása az inhibíciót követően

Annak érdekében, hogy a miR-206 *SMARCB1*-re és további célgénjeire gyakorolt csendesítő, vagy esetlegesen génexpressziót fokozó hatását megvizsgáljuk az SS-iASC, iASC, Caco2, HT-1080 és HDFα sejtvonalakat permanensen transzfektáltuk. A transzfekció hatására bekövetkezett célgének relatív génexpresszióját a 15. ábra mutatja. A miR-206 hatására bekövetkezett szignifikáns ($p<0,05$) génexpresszió változásokat az alábbiakban tárgyaljuk. A célgének relatív expressziójának átlagértékei, valamint a hozzájuk tartozó standard deviációs értékek, p értékek és szignifikancia a 18. táblázatban látható.



15. Ábra: A miR-206 target gének relatív expressziós szintjei. A bal oldali oszlopdiagramok a *SMARCB1*, *ACTL6A*, *CCND1*, *POLA1*, *SNAI1*, *MET* és *G6PD* relatív mRNS expresszióját jelölik a permanens transzfekciót követően SS-iASC-206, iASC-206, Caco2-206 és HT-1080-206 sejtekben. A jobb oldali oszlopdiagramok ugyanezen célgének expresszióját mutatják a miR-206 gátlása után. (*p<0,05)

A *SMARCB1* génexpresszió relatív szintje 64%-ra csökkent az SS-iASC-206, 83%-ra az iASC-206 és 81%-ra a Caco2-206 sejtekben, míg a HT-1080-206 sejtekben 143%-ra emelkedett.

Az *ACTL6A* génexpressziója hasonlóan a *SMARCB1*-hez lecsökkent az SS-iASC-206, iASC-206 és Caco2-206 sejtekben 68%-ra, 48%-ra és 78%-ra, míg a HT-1080-206 sejtekben 143%-ra emelkedett.

A *CCND1* gén mindegyik sejtvonalban csendesedett. Az SS-iASC-206-ban 42%-ra, az iASC-206-ban 64%-ra, a Caco2-206-ban 84%-ra, míg a HT-1080-206-ban 87%-ra.

A *POLA1* génexpresszió csak az SS-iASC-206 és a Caco2-206 sejtekben csökkent 46%-ra, illetve 83%-ra. Míg a HT-1080-206 transzfektánsokban 160%-ra emelkedett.

A *NOTCH3* expresszió szignifikánsan kizárólag a Caco2-206 sejtekben csökkent 62%-ra.

A *MET* génexpresszió az SS-iASC-206-ban, az iASC-206-ban és a Caco2-206-ban csökkent 50%-ra, 74%-ra és 78%-ra.

A *G6PD* gén csendesítése az iASC-206 és a HT-1080-206 sejtekben 80%, illetve 73% volt.

A *SNAI1* expresszió 175%-ra emelkedett az iASC-206 sejtekben, míg az SS-iASC-206-ban 59%-ra és a Caco2-206-ban 77%-ra csökkent.

A miR inhibíciós kísérleteket a fenti eredményeink megerősítésére végeztük. A miR-206 miRNS gátlását követő kísérletekben a célgének expressziója a miR-206 transzfektánsokban mért mRNS szintekkel mindig ellentétesen változott (15. ábra). Például a *SMARCB1* génexpresszió a miR-206 miRNS gátlás után 90%-ra emelkedett az SS-iASC-206-ban, 97%-ra az iASC-206-ban, 88%-ra a Caco2-206-ban és 100%-ra a HT-1080-206-ban.

18. Táblázat: A célgének expressziójának statisztikai adatai

[a] A miR-206 célgének relatív expressziójának átlagértéke q-RT-PCR után; [b] Standard deviáció; S* szignifikáns; NS nem szignifikáns

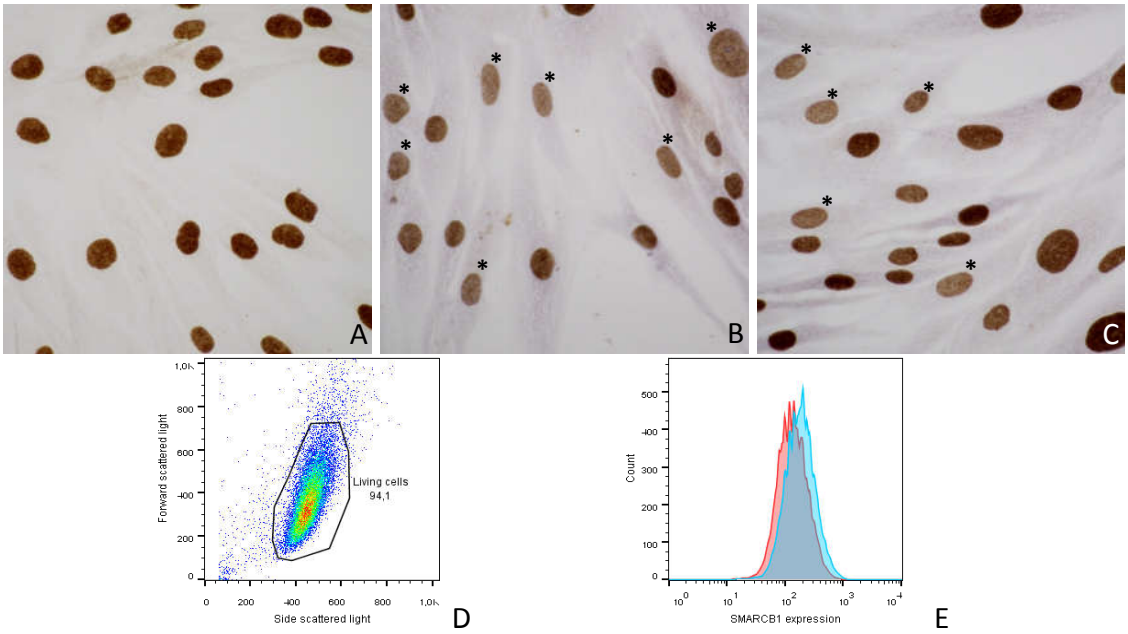
Sejtvonal	Célgén	Átlagérték[a]	SD[b]	P érték	Szignifikancia
SS-iASC-206	SMARCB1	64	1.51	0.034	S*
	ACTL6A	68	2.86	0.034	S*
	CCND1	42	8.33	0.022	S*
	POLA1	46	11.28	0.022	S*
	NOTCH3	114	6.34	0.054	NS
	MET	50	6.48	0.022	S*
	G6PD	103	4.21	0.143	NS
	SNAI1	59	6.38	0.022	S*
iASC-206	SMARCB1	83	0,87	0,034	S*
	ACTL6A	48	7,65	0,022	S*
	CCND1	64	2,94	0,034	S*
	POLA1	70	4,95	0,054	NS
	NOTCH3	104	6,91	0,137	NS
	MET	74	7,53	0,034	S*
	G6PD	80	1,77	0,034	S*
	SNAI1	175	7,43	0,022	S*
Caco2-206	SMARCB1	81	3,32	0,034	S*
	ACTL6A	78	12,31	0,034	S*
	CCND1	84	6,82	0,034	S*
	POLA1	83	11,45	0,034	S*
	NOTCH3	62	6,32	0,022	S*
	MET	78	8,12	0,034	S*
	G6PD	83	3,35	0,054	NS
	SNAI1	77	9,29	0,034	S*
HT-1080-206	SMARCB1	143	10.02	0.022	S*
	ACTL6A	146	17.71	0.022	S*
	CCND1	87	4.93	0.034	S*
	POLA1	160	19.25	0.022	S*
	NOTCH3	76	7.57	0.054	NS
	MET	83	12.06	0.054	NS
	G6PD	73	3.04	0.034	S*
	SNAI1	91	7.63	0.054	NS

4.2.3. A SMARCB1 fehérje expresszió változása permanens miR-206 transzfekciót követően

Az SS-iASC-206, iASC-206 és Caco2-206 sejteknél tapasztalt szignifikáns *SMARCB1* mRNS csendesítés mellett kíváncsiak voltunk, hogy fehérje szinten hogyan változik a SMARCB1 expressziója. Ehhez Western blot, immuncitokémiai és áramlás citometriás vizsgálatokat végeztünk.

A Western blot vizsgálatot elvégezve valamennyi transzfektált és nem transzfektált sejt esetén azt tapasztaltuk, hogy a miR-206-ot permanensen kifejező sejtek esetén nem következett be szignifikáns változás a SMARCB1 fehérje expressziójában, összehasonlítva a nem transzfektált és üres vektorral transzfektált sejtekkel.

A SMARCB1 immuncitokémiai vizsgálatokat az SS-iASC és SS-iASC-206 sejteken hajtottuk végre. Az SS-iASC-206 sejtek egy szubpopulációjának sejtmagjaiban mérsékelt SMARCB1 expresszió csökkenést figyeltünk meg, összehasonlítva az SS-iASC sejtek magjaival, ahol egyenletes erős festődés volt látható (16/a, 16/b és 16/c ábra). Az áramlás citometriai méréseket az SS-iASC és SS-iASC-206 sejteken végeztük el. A vizsgálatok során hasonlóan az immuncitokémiai vizsgálat eredményeihez az SS-iASC-206-ban mérsékelt fehérje expresszió csökkenést tapasztaltunk az SS-iASC sejtekhez képest (16/d és 16/e ábra).



16. Ábra: A SMARCB1 immuncitokémia és áramlás citometria eredményei az SS-iASC és SS-iASC-206 sejtekben. Az SS-iASC sejtek magjaiban megtartott a SMARCB1 expresszió (A). Az SS-iASC-206 sejtek erősen pozitív sejtmagjai között *-gal jelölt csökkent SMARCB1 expressziót mutató sejtmagok látszanak a sejtek egy szubpopulációjában (B és C). A SMARCB1 expresszió mérése áramlás citometria segítségével: a sejttörmeléket „forward scattered", vagyis előre szórt fény és „side scattered", vagyis oldalra szórt fény segítségével zártuk ki (D). A SMARCB1 fluoreszcencia intenzitása Alexa Flour® 647 konjugált kecskében termelt anti-egér IgG-vel jelölve az SS-iASC-206 és SS-iASC sejtekben. A piros hisztogram a miR-206 transzfektáns SS-iASC-206 sejtek populációját, a kék hisztogram a nem transzfektált SS-iASC sejteket mutatja (E).

4.3. Az SS18-SSX fúziós transzkriptum, mint biomarker synoviális sarcomás betegek likvid biopsziás mintáiban

4.3.1. A klinikai adatok áttekintése

Vizsgálatainkba 15 synoviális sarcomával diagnosztizált beteget vontunk be. Az összes beteg szövettani diagnózisa a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben történt az 3.19.-es fejezetben részletezett módszerekkel. A páciensek klinikai adatai a 19. táblázatban láthatók. A betegek között 4 férfi és 11 nő szerepelt. A diagnóziskor az átlagéletkor 45 év volt (tartomány: 24-72 év). Kilenc esetben (60%) a tumor perifériásan, míg 6 esetben (40%) centrálisan helyezkedett el. A daganat 5 esetben (33,3%) volt nagyobb 5 cm-nél. A diagnózis pillanatában 10 páciens (66,7%) betegsége volt áttétes, disszeminált, míg 5 beteg esetében (33,3%) nem volt kimutatható metastasis. Szövettanilag 11 daganat (73,3%) bizonyult monofázisosnak, míg 4 tumor (26,6%) bifázisos hisztológiát mutatott. Összesen 1 beteget (7,7%) kezeltek kizárólag sebészi úton, a további 14 páciens (93,3%) esetében a sebészi terápiát adjuváns kemo-és radioterápiával egészítették ki. A primer daganat 6 betegnél (40%) recidivált, mely minden esetben kisebb volt 5 cm-nél.

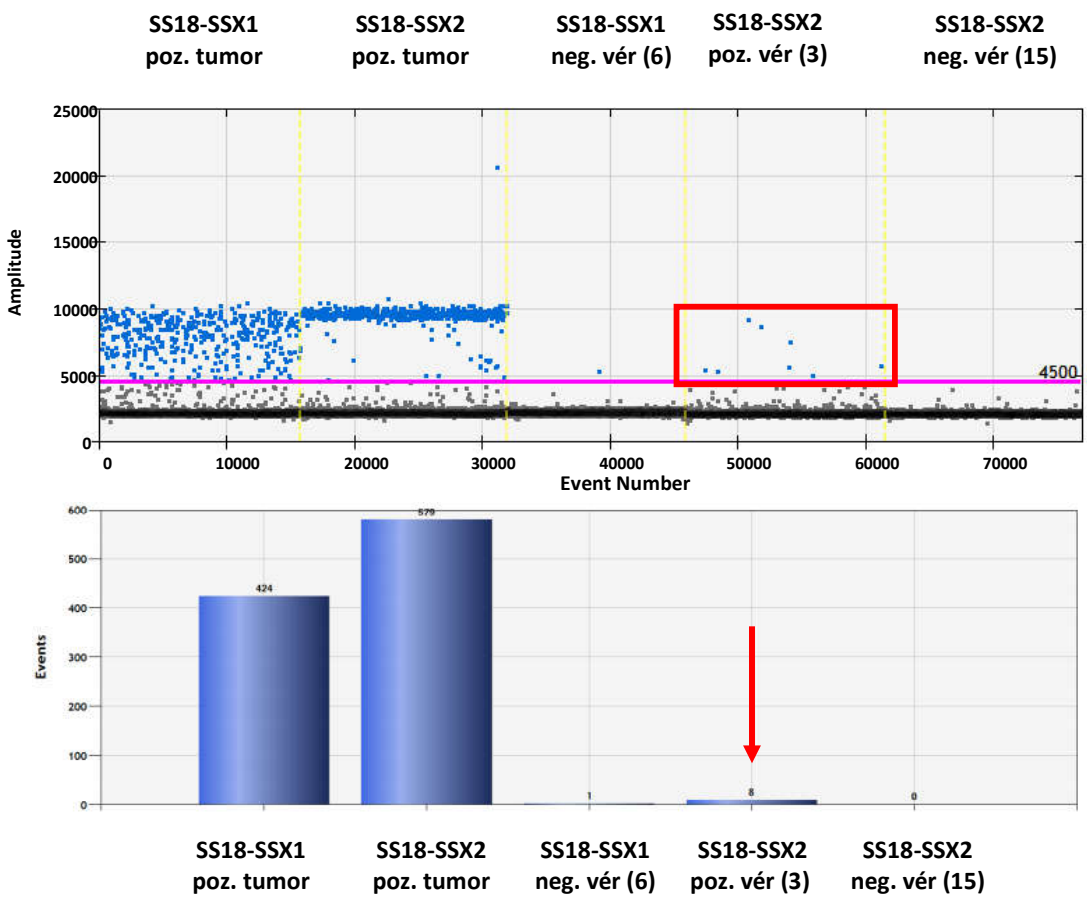
19. Táblázat: A synovialis sarcomás betegek klinikai adatai

[a] kor években; [b] a primer tumor elhelyezkedése; [c] a primer tumor legnagyobb átmérője; [d] a rekurrens tumor legnagyobb átmérője
N: nő; F: férfi; NI: nem ismert; SX: sebészi kimetszés; E: Epirubicin; VIP: 3 ciklus Etopozid, Ifoszfamid és Ciszplatin; B: Biszfoszfonát; D: Dakarbazin; V: Vinkrisztin; P: Pazopanib; Dox: Doxorubicin; I: Ifoszfamid; G: Gemcytabin; Doc: Docetaxel; C: Karboplatin; Et: Etopozid; RT: radioterápia; CYVADIC: Ciklofiszfamid, Vinkrisztin, Adriamycin, Dakarbazin; mpx: multiplex; KIR: központi idegrendszer

Eset	Nem	Kor[a]	Lokalizáció[b]	Méret[c] (cm)	Terápia	Áttét helye	Rekurrencia mérete[d] (cm)	Szubtípus
1	N	49	jobb láb	5.5	SX+E+VIP−B+D+V	mpx. tüdő, csont, KIR	nincs rekurrencia	monofázisos
2	N	59	bal boka	4	SX+E+VIP+P	tüdő	nincs rekurrencia	bifázisos
3	N	29	tüdő	NI	SX+E+P	tüdő	nincs rekurrencia	bifázisos
4	F	40	gluteális régió	7	SX+E	nincs áttét	nincs rekurrencia	monofázisos
5	F	42	bal kéz	1	SX+VIP+Dox+P+D+V	mpx. tüdő	2.8	monofázisos
6	N	24	bal preszakrális régió	NI	SX+E+I+P	mpx. tüdő	4	monofázisos
7	N	45	bal láb	NI	SX+E+I+G+Doc+P+D+V+C+Et	mpx. tüdő, máj	3	monofázisos
8	N	30	hasfal	10	SX+E	nincs áttét	3.5	monofázisos
9	N	57	jobb tenyér	3	SX	nincs áttét	1.5	bifázisos
10	N	52	nyak	NI	SX+RT+I	nincs áttét	nincs rekurrencia	monofázisos
11	N	55	bal alkar	NI	SX+E	tüdő	2.1	monofázisos
12	N	42	jobb alkar	3.9	SX+E+VIP+P	mpx. tüdő, mediastinum	nincs rekurrencia	monofázisos
13	F	26	jobb térdhajlat	10	SX+E+P+VIP	mpx. tüdő, vese	NI	monofázisos
14	N	72	jobb talp	5	SX+E	nincs áttét	nincs rekurrencia	monofázisos
15	F	50	bal láb	NI	SX+CYVADIC+E+D+P+G+Doc	mpx. tüdő, pleura, mediastinum	nincs rekurrencia	bifázisos

17. Ábra: Az *SS18-SSX* fúziós gén kimutatása nested PCR-rel. Pozitív kontrollként két SS FFPE tumormintát (A és B) és az SS-iASC sejtvonalat (C) használtuk. Az *SS18-SSX* fúziós termék 212 bp nagyságú. A 15 betegben nem volt detektálható fúziós géntermék. Endogén kontrollnak *GAPDH*-t (92 bp) használtunk. * Molekulasúly marker.

A ddPCR eredményeket a 18. ábrán és a 20. táblázatban mutatjuk be. A pozitív kontrollként használt SS minták esetében 424 pozitív esemény volt kimutatható az *SS18-SSX1* fúziós gént kifejező, 579 pozitív esemény az *SS18-SSX2* fúziós gént kifejező FFPE synoviális sarcoma mintában. Az *SS18-SSX1*-et kifejező SS-iASC sejtekből származó mintában 51 pozitív eseményt detektáltunk (20. táblázat). A 15 betegből 1 esetben (3. eset) 8 *SS18-SSX2* pozitív eseményt tudtunk detektálni (18. ábra és 20. táblázat). A fennmaradó 14 eset negatívnak bizonyult mind az *SS18-SSX1*, mind az *SS18-SSX2* tekintetében (20. táblázat).



18. Ábra: A ddPCR eredményei. A felső panelen kék színűek azok a dropletek, melyekben kimutatható az *SS18-SSX1*, vagy *SS18-SSX2* fúziós transzkriptum. A negatív dropletek szürkével jelöltek. Az amplitúdó (amplitude) a függőleges tengelyen, az eseményszám (event number) a vízszintes tengelyen jelölt. Az alsó panel az eseményszámot mutatja oszlopdiagram formában. Az első két oszlop a kettő SS FFPE tumormintát reprezentálja, az első az *SS18-SSX1*-et, a második az *SS18-SSX2*-t fejezi ki. A további három oszlop három vérmintát mutat be: a 6., a 3. és a 15. esetet. Ezek közül az egyikben (3. eset) alacsony számban (8 esemény) volt kimutatható az *SS18-SSX2*-es kiméríkus génátirat, melyet piros kerettel és piros nyíllal jelöltünk.

20. Táblázat: A ddPCR eseményszámai

SS1-SS2: FFPE blokkból származó synovialis sarcoma tumorszövet (az SS1 a 15. eset, az SS2 a 6. eset tumorszövete), SS-iASC: *SS18-SSX1* fúziós gént kifejező immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejt, 1-15: vérminták, iASC: immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejt, Caco2: humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonal, HT-1080: humán fibrosarcoma sejtvonal

Esetszám	Eseményszám (SS18-SSX1)	Eseményszám (SS18-SSX2)
SS1	424	0
SS2	0	579
SS-iASC	51	0
1	0	1
2	0	3
3	1	8
4	0	2
5	0	2
6	1	1
7	0	1
8	1	3
9	0	2
10	0	3
11	2	1
12	2	3
13	0	1
14	1	1
15	0	0
iASC	0	3
Caco2	1	1
HT-1080	2	2

5.MEGBESZÉLÉS

Tanulmányunkban a *SMARCB1* és más miR-206 célpont gének epigenetikai érintettségét vizsgáltuk normál, tumoros, valamint genetikailag módosított *in vitro* sejttenyészeti modellek segítségével. Ezek mellett a synovialis sarcoma fúziós génjének detektálását céloztuk meg synovialis sarcomás páciensek likvid biopsziás mintáiban.

A SMARCB1 sejtmagi expressziójának hiánya számos daganatban azonosítható (38), de a fehérje vesztését először malignus rhabdoid tumorban mutatták ki (127). Ennek hátterében a gén biallélikus deléciója áll, míg más tumorok esetén, mint például az epithelioid sarcomában a funkcióvesztésért többnyire epigenetikai módosítások felelősek (71, 128). Mostani munkánkat megelőzően epithelioid sarcoma minták esetén igazoltuk, hogy a *SMARCB1* funkcióvesztés hátterében csak ritkán áll a gén biallélikus genetikai eltérése, illetve nem mutatható ki a *SMARCB1* gén promóter régiójának hipermetilációja, sem az EZH2 metiltranszferáz túlműködése, mely a H3 hiszton trimetilációját (H3K27 Me3) okozná. Így figyelmünk az RNS interferencia irányába terelődött és *in silico* miRNS target predikció módszerét alkalmazva azonosítottunk 4 miRNS-t (miR-206, miR-381, miR-671-5p, miR-765), melyeknek a *SMARCB1* célgénjük. Megvizsgálva az epithelioid sarcomákból származó szöveti mintákat az előbb említett miR-ek expressziója szignifikáns emelkedést mutatott. Ezt követően *in vitro* sejttenyészeti modellekben a miRNS-ekkel tranziens transzfekciót végeztünk és azt láttuk, hogy a mikroRNS-ek, a miR-765 kivételével, sikeresen csendesítették a *SMARCB1* gén kifejeződését mind mRNS, mind fehérje szinten (71, 128). Ezután jelen munkánk előkészítéseképp 223 lágyrész daganatban vizsgáltuk a SMARCB1 és a fenti miRNS-ek expresszióját, és kimutattuk, hogy a SMARCB1 teljesen, vagy részlegesen elvész epithelioid sarcoma, malignus rhabdoid tumor, malignus perifériás ideghüvely tumor, myoepithelialis carcinoma, extraskeletalis myxoid chondrosarcoma és synovialis sarcoma esetén. A funkcióvesztés hátterében a fenti miRNS-ek overexpressziója állhat. Érdekes megfigyeléseket tettünk a bifázisos synovialis sarcomák kapcsán. Ezek szöveti blokkjain elvégzett SMARCB1 immunhisztokémiai festés során az orsósejtes komponens csaknem teljesen negatívan, míg az epitheliális komponens pozitívan jelölődött. Lézer mikrodisszekciót követően az orsósejtes és az epithelsejtes komponensekben külön-külön megvizsgáltuk a funkcionálisan aktív miRNS-ek expresszióját. Az orsósejtes komponensekben szignifikánsan magasabb, míg az epithelsejtes izolátumban szignifikánsan alacsonyabb miRNS expressziós szinteket

mértünk (22). A talált eredmények figyelmünket a synovialis sarcomára irányították. Kadoch és Crabtree 2013-ban kimutatta, hogy a Kohashi által felfedezett SMARCB1 expresszió csökkenés hátterében az SS18-SSX fúziós fehérje állhat, mely versengve a vad típusú SS18 és SMARCB1 fehérjékkel kiszorítja azokat a SWI/SNF kromatin-átrendező komplex-ből. A folyamat végén a SMARCB1 degradálódik (21). Mindezzel egyre elfogadottabbá vált, hogy synovialis sarcomában a tumorképzés kulcsfontosságú lépése maga a fúziós gén létrejötte és annak kölcsönhatása a transzkripciót közvetlenül befolyásolni képes molekulákkal (13). Az általunk bemutatott bifázisos synovialis sarcomák szöveti mintáiban jelenlévő miRNS expressziós különbségek azonban árnyalják a képet, ugyanis mind az orsó- és epithelsejtek egyaránt kifejezik a betegségre patognomikus *SS18-SSX* fúziós gént, SMARCB1 expressziójuk mégis eltér.

A fenti munka folytatásaként első lépésben bizonyítani szerettük volna, hogy az *in vitro* kísérletekben használni kívánt SS-iASC sejtvonal stabilan expresszálja-e az *SS18-SSX1* fúziós gént. A sejtvonal egyediségét az STR analízis erősítette meg. A sejtvonal összehasonlítva a kiindulási iASC sejtvonallal citogenetikailag ugyanazokat a szerkezeti és számbeli kromoszóma eltéréseket mutatta. A sejtvonalba bejuttatott *SS18-SSX1* fúziós konstrukción lévő HA-jelölést fehérje szinten immunfluoreszcens immuncitokémiai festéssel és Western blot vizsgálattal egyaránt kimutattuk. A fúziós gén mRNS szintű expresszióját mind a nested PCR, mind a q-RT-PCR megerősítette. Annak érdekében, hogy a jelenleg rendelkezésre álló teljes diagnosztikai palettát felhasználjuk a sejtvonal bemutatására, FISH vizsgálattal a synovialis sarcomára specifikus transzlokációs próbákat alkalmaztuk, melyekkel nem volt kimutatható a sejtekbe bejuttatott kimérikus konstrukció. Mindennek oka, hogy a sejtvonalba bekerült fúziós gén random genomikus lókuszba épül be és méretében túlságosan kicsi a FISH-sel detektálható több kilobázis nagyságú citogenetikai eltérésekhez képest. Így ez a rutin diagnosztikában kitűnően alkalmazható módszer nem bizonyult használhatónak az SS-iASC sejtvonalban a transzlokáció azonosítására (123).

Az SS-iASC és iASC sejteken elvégzett immuncitokémiai eredményeink izgalmasnak bizonyultak. Az SS-iASC sejtekben a fokális cytokeratin pozitivitást leszámítva minden egyéb synovialis sarcomára karakterisztikus marker, név szerint a TLE1, SYT, Cyclin D1, Bcl2, EMA és CD117 negatív volt. A β-catenin erős citoplazmatikus jelölődést mutatott, szemben az iASC sejtekkel, azonban a daganatra jellemző magi akkumulációt nem mutatta egyik sejtvonalban sem. A mezenchimális markerek közül a vimentin erősen pozitívan festődött. A látott kép alapján

megállapítottuk, hogy a mezenchimális epithelialis tranzíción (MET) kívül más jelátviteli útvonal nem aktiválódott az SS18-SSX1 transzfekció eredményeként (123, 129).

A fúziós gén betegségben betöltött szerepét korábban már több munkacsoport is tanulmányozta, döntően egér sejtvonalak és génmanipulált egér modellrendszerek segítségével. Egy 2012-es tanulmányban létrehozott *SS18-SSX1*-et expresszáló humán csontvelői eredetű mezenchimális sejtvonalat SCID (severe combined immunodeficiency, súlyos kombinált immundefektus) egerekbe oltva a sejtek nem formáltak daganatot (130). Ezzel ellentétben egy másik kutatócsoport szerint az *SS18-SSX* fúziós gén tumorformáló képessége kétségtelen egérmodellekben, ugyanis, ha rágcsálóból származó fibroblastokban expresszáltatták az *SS18-SSX1* fúziós gént, akkor ezek a sejtek 'nude' egérben olyan tumort formáltak, mely synovialis sarcomára emlékeztető morfológiát mutatott (4). Egy másik munkacsoport az *SS18-SSX2* bejuttatását követően az indukált célgéneket vizsgálta humán pluripotens őssejtekben és humán mezenchimális őssejtekben. Azt találták, hogy a két sejtvonalban a fúziós gén teljesen más gének expresszióját változtatta meg, jelezve ezzel a celluláris mikrokörnyezet befolyását (131). A feltevés, miszerint az *SS18-SSX* fúziós gén kialakulása önmagában elegendő lépés a tumorképzéshez, többek között a fenti egérmodelleken alapult. Kiderült azonban, hogy a humán *SS18-SSX* fúziós gén kevésbé onkogén tulajdonságú, mint az alveolaris lágyrész sarcomára jellemző ASPSCR1-TFE3 és a clear cell sarcomára jellemző EWSR1-ATF1 fúziós onkogének (132, 133), így lehetséges, hogy a humán *SS18-SSX* fúziós gén másképp viselkedik és eltérő onkogenitással bír egér és humán sejtekben. A fenti szakirodalmi adatokat összegezve úgy gondoltuk, hogy az SS-iASC sejtvonalunk alkalmas lehet a kimérikus *SS18-SSX1* gén funkciójának *in vitro* vizsgálatára, továbbá lehetőséget adhat annak elemzésére, hogy vajon szükségesek-e egyéb epigenetikai szintű változások a synovialis sarcoma tumorképzéséhez (123).

Következő lépésként a humán miR-206 permanens transzfekcióját végeztük el a HDFα, a HT-1080, a Caco2, az iASC és az SS-iASC sejtvonalakon. Választásunk azért esett a korábbi négy miRNS közül a miR-206-ra, mert az *in vitro* tranziens transzfekciós kísérletek során ez a miRNS mutatta a legerősebb *SMARCB1* géncsendesítő hatást. A permanens miR-206 transzfektáns sejtek antibiotikummal végzett szelekcióját követően mindegyik sejtvonal stabilan, legalább 138-szorosan overexpresszálta a miR-206-ot (134).

A miR-206-ot a korábbi HDFα, Caco2 és HT-1080 sejteken elvégzett kísérleteink alapján onkomiR-nek gondoltuk a *SMARCB1*-re gyakorolt csendesítő hatása miatt. A *SMARCB1* mellett szakirodalmi adatok alapján további 6 miR-206 célgént választottunk és ezek mRNS szintű expressziójának elemzését terveztük. A vizsgálandó célgének (*ACTL6A*, *CCND1*, *POLA1*, *NOTCH3*, *MET* és *G6PD*) onkogén funkciót látnak el többek között rhabdomyosarcoma (RMS) (99, 135, 136), világossejtes veserák (137) és méhnyakrák (138) esetén, valamint differenciációt serkentő hatást gyakorolnak myoblastokban (139). Míg kifejeződésük emelkedést mutatott a tumorszövetekben és a tumoros sejtvonalakban egyaránt, addig a miR-206 szintje alulexpresszáltnak bizonyult a mintákban (99, 135-138). Ha *in vitro* körülmények között fokozták a miR-206 szintet a sejtekben, akkor a RMS sejtekben az *ACTL6A*, a *MET* és a *G6PD* szint lecsökkent és ezzel párhuzamosan a tumornövekedés leállt, a sejtek kiértek, valamint a pentóz-foszfát útvonal aktivitása is csökkent, mivel a miR-206 gátolta a metabolikus útvonal sebességmeghatározó lépését katalizáló *G6PD* génkifejeződését (99, 135, 136). Világossejtes veserákban a miR-206 szint növelése a *CCND1* alulszabályozódásán keresztül a sejtciklus G0/G1 fázisban való leállását eredményezte (137). A HeLa sejtvonalban a miR-206 növekedés a *NOTCH3* csendesítésén keresztül a sejtek apoptózisát segítette elő (138). Myoblast kultúrákban a miR-206 a *POLA1* (ezáltal a DNS szintézis) gátlásán keresztül antiproliferatív hatást fejtett ki (139). Tehát a miR-206 szuppresszor miR funkciót töltött be ezen célgének esetén. A *SNAI1* a fenti génekkel ellentétben nem célpontja a miR-206-nak, azonban mint ismert EMT markert vontuk be vizsgálatainkba. Expressziója elsősorban az SS-iASC-206 sejtvonal esetén érdekelt minket, tekintettel arra, hogy az SS-iASC sejtvonalban a fúziós gén mezenchymális epithelialis tranzíciót indukált (123). Áttekintve a fenti információkat másik megvilágításból szerettük volna vizsgálni a miR-206 célgénekre gyakorolt hatását új, eddig nem tesztelt normál, tumoros és genetikailag módosított sejtvonalakban. A transzfekciót és az antibiotikum szelekciót követően végül csak 4 sejtvonalat tudtunk elemezni, ugyanis a HDFα sejtek megrekedtek a növekedésben és elpusztultak. Ennek oka az lehetett, hogy a miR-206 downregulálta a *CCND1*-et és a *POLA1*-et, melynek következtében a proliferáció gátlás alá került, a sejtciklus leállt és a sejtek elpusztultak, tehát a miR-206 feltételezhető, egyedüli hatása normál sejtvonalakon a proliferáció gátlása.

Kísérleteink során az SS-iASC-206 sejtekben a *SMARCB1* mRNS expresszió 64%-ra csökkent, míg az iASC-206-ban ez 83% volt. Az SS-iASC-206 esetén látott nagyobb csökkenés hátterében a kimérikus SS18-SSX1 fehérje és a miR-206

szinergikus hatása állhat, így mRNS szinten az *in vitro* kísérletek alapján is igazoltnak vettük a bifázisos synovialis sarcomákban kimutatott miR-206 overexpresszió okozta *SMARCB1* csökkenést (22, 134). Fehérjeszinten, Western blot módszer használatával nem tudtunk szignifikáns SMARCB1 csökkenést kimutatni az SS-iASC-206 sejtvonalban, azonban érdekesek voltak a SMARCB1 immuncitokémiai és áramlás citometriai vizsgálattal kapott eredmények. Az SS-iASC-206 sejtek egy szubpopulációjában mérsékelt SMARCB1 expresszió csökkenés látszott szemben a nem transzfektált SS-iASC sejtekkel, ahol egyenletesen festődő sejtmagokat láttunk. Ugyanezt a mérsékelt csökkenést áramlás citometriával is kimutattuk. Az mRNS és fehérje szinten tapasztalt SMARCB1 expressziós eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy ebben a szubpopulációban a miR-206 hatékonyabban ki tudta fejteni a SMARCB1 fehérje expressziót csökkentő hatását, szemben a többi sejttel, amelyek valamilyen módon kompenzálhatták a miR-206 alulszabályozó hatását (134). Az is elképzelhető, hogy egyéni sejtszinten mind a kimérikus gén, mind a miR-206 hatása különböző mértékben nyilvánult meg. Ezt a feltételezésünket Mukherji és munkatársai eredményei támasztják alá, akik két színnel rendelkező fluoreszcens riporter rendszert felhasználva többek között áramlás citometria segítségével mérték az adott célgén transzkripcióját és transzlációját bizonyítva, hogy a célgénre kifejtett miRNS-ek általi represszió foka egy sejtpopulációban mérsékelt és igen nagy variabilitást mutat, ha egyenként vizsgáljuk a sejteket (140). Összefoglalva a látott SMARCB1 expressziós eredményeinket megállapítottuk, hogy a miR-206 fontos szerepet játszik a *SMARCB1* gén csendesítésében synovialis sarcomában, de önmagában nem elegendő a fehérje expresszió csökkentéséhez (134).

A génexpressziós mérések során a *SNAI1* downregulálódott az SS-iASC-206 sejtekben és overexpresszálódott az iASC-206 sejtekben (134). Ismert tény, hogy a bifázisos synovialis sarcomák szinte mindig az *SS18-SSX1* fúziós gént fejezik ki. A fúziós protein gátolja a SNAI1 fehérjemolekulát, ami az E-Cadherin promóterének legerősebb represszora. Így a SNAI1 által okozott transzkripciós represszió alól az E-Cadherin promótere felszabadul, ami mezenchimális epithelialis tranzícióban nyilvánul meg, magyarázva a mirigyszerű struktúrákba rendeződő epithelialis komponens kialakulását. Saito és munkatársai azt találták, hogy a fúziós gén E-Cadherinre kifejtett derepressziós hatása annál erősebb, minél több az endogén SNAI1 a sejtben (141). Az SS-iASC-206-ban látott downregulációt a fúziós gén és a miR-206 együttes hatása okozta. Korábbi génexpressziós méréseink során az SS-iASC sejtekben már

tapasztaltuk a *SNAI1* alulszabályozódását, ez azonban nem volt olyan mértékű, mint az SS-iASC-206 sejtekben látott (134).

Az SS-iASC-206, az iASC-206 és a Caco2-206 sejtvonalakban a *SMARCB1* mellett az *ACTL6A* és a *POLA1* is alulszabályozódott, tehát ezen sejtvonalak esetén a miR-206 szuppresszor miR funkciót töltött be, míg a HT-1080-206 sejtekben mindhárom célgén felülszabályozódott, vagyis ebben a sejtvonalban feltételezhetően onkomiR-ként működött. A *CCND1* és a *MET* voltak azok az onkogének, melyek esetén a miR-206 minden sejtvonalban szuppresszor miR-ként funkcionált. A *NOTCH3* csak a Caco2-206 sejtekben mutatott szignifikáns eredményt, ahol expressziója csökkent a miR-206 hatására. A *G6PD* downregulálódott az iASC-206, Caco2-206 és HT-1080-206 sejtekben, míg nem változott az SS-iASC-206 esetén (134). Összefoglalva permanens miR-206 transzfekciós kísérleteinket megállapíthatjuk, hogy a miR-206 hatása az adott célgén kifejeződésére nagyban függ a kiindulási sejttípustól. Napjainkban a miRNS szintek változásainak detektálása számos betegség esetén kedvelt kutatási terület, azonban sokkal átfogóbb vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy egy adott tumorban betöltött pontos szerepüket megértsük. A miR-206 onkomiR-ként hatva a *SMARCB1*-re fontos, de nem kizárólagos szerepet játszik synovialis sarcomagenesisben (134).

Tanulmányunk utolsó lépéseként a synovialis sarcomában patognomikus fúziós gént szerettünk volna detektálni synovialis sarcomával diagnosztizált és kezelésen átesett betegek esetén.

A synovialis sarcomás betegekben a kombinált kezelések ellenére igen nagy arányú a lokális recidíva és a távoli metastasis kialakulása. A véráramban, vagy bármely más testfolyadékban keringő tumorsejtek, illetve tumor eredetű sejtmentes szabad nukleinsavak napjainkban a rákkutatás egyik gyakran tanulmányozott területét képezik. A transzlokáció pozitív lágyrésztumorok esetén a specifikus fúziós transzkriptum kimutatása ígéretes módszernek bizonyult Ewing sarcoma és alveolaris rhabdomyomasarcoma esetén (142, 143). Mivel a lágyrésztumorok közül synovialis sarcoma esetén mindeddig ellentmondásos eredmények születtek a témában, így célunk volt, hogy a lehető legtöbb klinikai stádiumot lefedő betegcsoportban 6 hónappal a terápiát követően megvizsgáljuk a vérben keringő tumorsejtek és szabad tumor eredetű nukleinsavak jelenlétét.

A perifériás vérmintákból izolált RNS mintáinkat reverz transzkripciót követően nested PCR-rel és ddPCR-rel vizsgáltuk. A vizsgált 15 betegből 12-nek volt a 6

hónapos vérvétel időpontjában lokális recidívája vagy áttéte, így meglepve tapasztaltuk, hogy csak egy esetben tudtunk detektálni kis mennyiségben *SS18-SSX2*-es fúziós transzkriptumot ddPCR segítségével. Ez a páciens a vérvételkor tüdő áttéttel rendelkezett. A két alkalmazott módszer közül csak a ddPCR tudta igazolni a kis mennyiségű fúziós transzkriptumot, ami nested PCR-rel nem volt kimutatható ugyanezen mintából (144).

A bevezetésben említett, szakirodalomban szereplő két synovialis sarcomában szenvedő páciens perifériás vérmintájából csak a terápiás beavatkozások előtt volt detektálható a fúziós transzkriptum, a terápiát követő 6. hónapban a disszeminált betegség ellenére sem tudták kimutatni az *SS18-SSX*-et. Kiemelendő, hogy mindkét munkacsoport kizárólag nested PCR módszert alkalmazott a fúziós gén azonosítására (119, 120).

A két esetet és saját betegcsoportunkat egybevéve megállapítottuk, hogy keringő tumorsejtek, illetve szabad tumor eredetű nukleinsavak ritkán kerülnek a véráramba sebészi és/vagy kemoterápián, illetve radioterápián átesett synovialis sarcomás betegek esetén, vagyis ez a módszer a tumor kiújulás, vagy áttét kimutatására kevésbé alkalmas (144).

6.KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat főbb megállapításai a következők:

- Elsőként hoztuk létre és alkalmaztuk *in vitro* sejttenyészeti modellként az *SS18-SSX1*-et kifejező immortalizált zsírszöveti eredetű mezenchimális őssejtvonalat, az SS-iASC-t, mely alkalmas *in vitro* modellrendszere a synovialis sarcomának.

- Az SS-iASC sejtvonal mind mRNS, mind fehérje szinten stabilan kifejezi az *SS18-SSX1* fúziós gént.

- Az SS-iASC sejtvonalban a fúziós gén sikeresen indukált mezenchimális epithelialis tranzíciót.

- A permanens miR-206 transzfekció után 4 sejtvonalban (iASC-206, SS-iASC-206, Caco2-206 és HT-1080-206) mért különböző génexpressziós értékek arra utalnak, hogy a miR-206 adott célgénre gyakorolt hatása sejtvonal-függő, vagyis a miR-206 egy erősen szövet-és sejtspecifikus miRNS.

- A SMARCB1 esetén látott mRNS és fehérjeszintű eredmények arra utalnak, hogy a miR-206 onkomiRNS szerepe fontos, de nem kizárólagos a *SMARCB1* gén csendesítésében synovialis sarcoma esetén.

- Synovilais sarcomás betegeinkkel végzett vizsgálataink alapján megállapítjuk, hogy a kezelés alatt álló betegekben a tumor eredetű nukleinsav fragmentumok kimutathatósága ritka eseménynek számít, így a fúziós gén likvid biopsziás mintákban való kimutatása kevésbé alkalmas módszer a kiújulás követésére, vagy egy esetleges metastasis kialakulásának detektálására.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *SMARCB1* tumorszuppresszor gén funkcióvesztése számos rosszindulatú daganatban kimutatható, melynek hátterében genetikai és epigenetikai eltérések állnak. A *SMARCB1*-deficiens lágyrésztumorok közé tartozó synovialis sarcoma a csökkent expressziót mutatók csoportjába sorolható. A daganat jellegzetes genetikai eltérése az *SS18-SSX1/SSX2/SSX4* fúziós gén. A kimérikus gén synovialis sarcomagenezisben betöltött szerepét számos sejtvonalban és genetikailag módosított modellrendszerben tanulmányozták, azonban ellentmondásos eredmények születtek, így a betegség patogenezisének hátterében más genetikai és epigenetikai mechanizmusok is szerepet játszhatnak. Első lépésként egy humán sejtvonalat mutattunk be, mely mind mRNS, mind fehérje szinten kifejezi az *SS18-SSX1* fúziós gént, így alkalmas *in vitro* modell a fúziós gén hatásának tanulmányozására. Bifázisos synovialis sarcomában a SMARCB1 fehérje expresszió az epithelsejtekben megtartott, míg az orsósejtekben csökkent, melyért a két komponens eltérő miRNS expressziós profilja felel. Második lépésként a miR-206 onkomiR hatásait vizsgáltuk *in vitro* permanens miR-206 transzfekcióval, mely az egyik leghatékonyabb *SMARCB1*-et csendesítő miRNS. Elemeztük a *SMARCB1* és további 6 célgén, valamint egy EMT marker expresszióját egy normál, egy adenocarcinoma, egy epithelialis fibrosarcoma és két genetikailag módosított immortalizált sejtvonalban, melyek egyike a fent említett *SS18-SSX1* fúziós gént kifejező sejtvonal volt. A mért génexpressziós értékek arra utalnak, hogy a miR-206 adott célgénre gyakorolt hatása sejtvonal-függő, vagyis a miR-206 egy erősen szövet-és sejtspecifikus miRNS. Az SS-iASC-206-ban tapasztalt *SMARCB1* mRNS és fehérje expresszió arra mutat rá, hogy a miR-206 mint onkomiR fontos, de nem kizárólagos szerepet tölt be a synovialis sarcoma patogenezisében. Végül a patognomikus *SS18-SSX* genetikai eltérés detektálását kíséreltük meg perifériás vérből egy 15 betegből álló betegcsoportban a személyre szabott terápiát követően 6 hónappal. Egy betegben tudtunk kis mennyiségben *SS18-SSX2* transzkriptumot azonosítani. Megállapítottuk, hogy kis mennyiségű géntermék kimutatására a ddPCR alkalmasabb, mint a nested PCR, illetve a szabadon keringő tumorsejtekből, vagy tumor eredetű nukleinsavakból származó fúziós transzkriptum kimutatása ritka eseménynek számít olyan betegekben, akik átestek valamilyen kezelésen.

8. SUMMARY

The loss of *SMARCB1* tumor suppressor gene caused by genetic and epigenetic alterations can be detected in many malignant tumors. Synovial sarcoma belongs to the *SMARCB1*-deficient malignant soft tissue tumors within the reduced expression group. The pathognomic genetic alteration of synovial sarcoma is the *SS18-SSX1*/*SSX2*/*SSX4* fusion gene. Multiple model systems have been developed to elucidate the role of the chimeric gene in synovial sarcomagenesis. These among others include mouse cell lines expressing *SS18-SSX*, and genetically engineered mouse models of synovial sarcoma, however their results were controversial. These allude to the possible role of other genetic and epigenetic alterations in synovial sarcomagenesis. First, we characterized a novel human cell line (SS-iASC) expressing *SS18-SSX1* both on mRNA and protein level. This cell line provides a suitable *in vitro* model for examining the effect of the fusion gene. In biphasic synovial sarcoma the expression of SMARCB1 protein is retained in the epithelial cells, while it is decreased in the spindle cells. The reason for this is the different miRNA expression profile of the two components. As the second step we examined the effects of the oncomiR miR-206 after permanent miR-206 transfection experiments in *in vitro* cell cultures, which is one of the most potent *SMARCB1* silencing miRNA. We analyzed the expression of *SMARCB1*, six other miR-206 target genes and an EMT marker gene in a normal, an adenocarcinoma, an epithelial fibrosarcoma and two genetically engineered cell lines. Among the two latter cell lines one was the *SS18-SSX1* fusion gene expressing cell line. The observed gene expression patterns refer to the fact, that the action of this miRNA is largely cell context-dependent and miR-206 is a tissue- and cell-specific miRNA. The detected SMARCB1 mRNA and protein expressions in SS-iASC-206 cells show that oncomiR effects of miR-206 on *SMARCB1* play an important, but not exclusive role in the pathogenesis of synovial sarcoma. Lastly we attempted to detect the pathognomic *SS18-SSX* genetic alteration of synovial sarcoma 6 months after the therapy in the peripheral blood samples of 15 patients. *SS18-SSX2* fusion transcript was identified in a small copy number in one patient. We concluded that ddPCR is more suitable for the detection of small amounts of this fusion gene compared to nested PCR. The detection of the fusion transcript from circulating tumor cells or cell-free nucleic acids is a rare event in patients who already underwent therapy.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Fisher C. (1998) Synovial sarcoma. Ann Diagn Pathol, 2: 401-421.
2. van de Rijn M, Barr FG, Xiong QB, Hedges M, Shipley J, Fisher C. (1999) Poorly differentiated synovial sarcoma: an analysis of clinical, pathologic, and molecular genetic features. Am J Surg Pathol, 23: 106-112.
3. Machen SK, Easley KA, Goldblum JR. (1999) Synovial sarcoma of the extremities: a clinicopathologic study of 34 cases, including semi-quantitative analysis of spindled, epithelial, and poorly differentiated areas. Am J Surg Pathol, 23: 268-275.
4. Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Kato H, Sonobe H, Minami A, Hiraga H, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K. (2001) Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. Proc Natl Acad Sci U S A, 98: 3843-3848.
5. Eilber FC, Dry SM. (2008) Diagnosis and management of synovial sarcoma. J Surg Oncol, 97: 314-320.
6. Verbeek BM, Kaiser CL, Larque AB, Hornicek FJ, Raskin KA, Schwab JH, Chen YL, Lozano Calderon SA. (2018) Synovial sarcoma of the shoulder: A series of 14 cases. J Surg Oncol, 117: 788-796.
7. Gofman A, Issakov J, Kollender Y, Soyfer V, Dadia S, Jiveliouk I, Flusser G, Bickels J, Meller I, Merimsky O. (2007) Synovial sarcoma of the extremities and trunk: a long-lasting disease. Oncol Rep, 18: 1577-1581.
8. Krieg AH, Hefti F, Speth BM, Jundt G, Guillou L, Exner UG, von Hochstetter AR, Cserhati MD, Fuchs B, Mouhsine E, Kaelin A, Klenke FM, Siebenrock KA. (2011) Synovial sarcomas usually metastasize after >5 years: a multicenter retrospective analysis with minimum follow-up of 10 years for survivors. Ann Oncol, 22: 458-467.
9. Spurrell EL, Fisher C, Thomas JM, Judson IR. (2005) Prognostic factors in advanced synovial sarcoma: an analysis of 104 patients treated at the Royal Marsden Hospital. Ann Oncol, 16: 437-444.
10. Lewis JJ, Antonescu CR, Leung DH, Blumberg D, Healey JH, Woodruff JM, Brennan MF. (2000) Synovial sarcoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 112 patients with primary localized tumors of the extremity. J Clin Oncol, 18: 2087-2094.

11. Singer S, Baldini EH, Demetri GD, Fletcher JA, Corson JM. (1996) Synovial sarcoma: prognostic significance of tumor size, margin of resection, and mitotic activity for survival. J Clin Oncol, 14: 1201-1208.
12. Spillane AJ, A'Hern R, Judson IR, Fisher C, Thomas JM. (2000) Synovial sarcoma: a clinicopathologic, staging, and prognostic assessment. J Clin Oncol, 18: 3794-3803.
13. de Bruijn DR, Nap JP, van Kessel AG. (2007) The (epi)genetics of human synovial sarcoma. Genes Chromosomes Cancer, 46: 107-117.
14. El Beaino M, Araujo DM, Lazar AJ, Lin PP. (2017) Synovial Sarcoma: Advances in Diagnosis and Treatment Identification of New Biologic Targets to Improve Multimodal Therapy. Ann Surg Oncol, 24: 2145-2154.
15. Guillou L, Benhattar J, Bonichon F, Gallagher G, Terrier P, Stauffer E, Somerhausen Nde S, Michels JJ, Jundt G, Vince DR, Taylor S, Genevay M, Collin F, Trassard M, Coindre JM. (2004) Histologic grade, but not SYT-SSX fusion type, is an important prognostic factor in patients with synovial sarcoma: a multicenter, retrospective analysis. J Clin Oncol, 22: 4040-4050.
16. Palmerini E, Benassi MS, Quattrini I, Pazzaglia L, Donati D, Benini S, Gamberi G, Gambarotti M, Picci P, Ferrari S. (2015) Prognostic and predictive role of CXCR4, IGF-1R and Ezrin expression in localized synovial sarcoma: is chemotaxis important to tumor response? Orphanet J Rare Dis, 10: 6.
17. Jagdis A, Rubin BP, Tubbs RR, Pacheco M, Nielsen TO. (2009) Prospective evaluation of TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker in synovial sarcoma. Am J Surg Pathol, 33: 1743-1751.
18. Jorgensen LJ, Lyon H, Myhre-Jensen O, Nordentoft A, Sneppen O. (1994) Synovial sarcoma. An immunohistochemical study of the epithelial component. Apmis, 102: 191-196.
19. Krskova L, Kalinova M, Brizova H, Mrhalova M, Sumerauer D, Kodet R. (2009) Molecular and immunohistochemical analyses of BCL2, KI-67, and cyclin D1 expression in synovial sarcoma. Cancer Genet Cytogenet, 193: 1-8.
20. Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Matono H, Iwamoto Y, Taguchi T, Tsuneyoshi M. (2010) Reduced expression of SMARCB1/INI1 protein in synovial sarcoma. Mod Pathol, 23: 981-990.
21. Kadoch C, Crabtree GR. (2013) Reversible disruption of mSWI/SNF (BAF) complexes by the SS18-SSX oncogenic fusion in synovial sarcoma. Cell, 153: 71-85.

22. Sapi Z, Papp G, Szendroi M, Papai Z, Plotar V, Krausz T, Fletcher CD. (2016) Epigenetic regulation of SMARCB1 By miR-206, -381 and -671-5p is evident in a variety of SMARCB1 immunonegative soft tissue sarcomas, while miR-765 appears specific for epithelioid sarcoma. A miRNA study of 223 soft tissue sarcomas. Genes Chromosomes Cancer, 55: 786-802.
23. Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, Gill S, Shipley J, Chan AM, Gusterson BA, Cooper CS. (1994) Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. Nat Genet, 7: 502-508.
24. Sandberg AA, Bridge JA. (2002) Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. Cancer Genet Cytogenet, 133: 1-23.
25. Dimitriadis E, Rontogianni D, Kyriazoglou A, Takou A, Frangia K, Pandis N, Trangas T. (2009) Novel SYT-SSX fusion transcript variants in synovial sarcoma. Cancer Genet Cytogenet, 195: 54-58.
26. de Leeuw B, Balemans M, Olde Weghuis D, Geurts van Kessel A. (1995) Identification of two alternative fusion genes, SYT-SSX1 and SYT-SSX2, in t(X;18)(p11.2;q11.2)-positive synovial sarcomas. Hum Mol Genet, 4: 1097-1099.
27. Skytting B, Nilsson G, Brodin B, Xie Y, Lundeberg J, Uhlen M, Larsson O. (1999) A novel fusion gene, SYT-SSX4, in synovial sarcoma. J Natl Cancer Inst, 91: 974-975.
28. Ladanyi M. (2001) Fusions of the SYT and SSX genes in synovial sarcoma. Oncogene, 20: 5755-5762.
29. Brett D, Whitehouse S, Antonson P, Shipley J, Cooper C, Goodwin G. (1997) The SYT protein involved in the t(X;18) synovial sarcoma translocation is a transcriptional activator localised in nuclear bodies. Hum Mol Genet, 6: 1559-1564.
30. Haldar M, Randall RL, Capecchi MR. (2008) Synovial sarcoma: from genetics to genetic-based animal modeling. Clin Orthop Relat Res, 466: 2156-2167.
31. Neigeborn L, Carlson M. (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 108: 845-858.

32. Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, Goff SP. (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. Science, 266: 2002-2006.
33. Muchardt C, Sardet C, Bourachot B, Onufryk C, Yaniv M. (1995) A human protein with homology to Saccharomyces cerevisiae SNF5 interacts with the potential helicase hbrm. Nucleic Acids Res, 23: 1127-1132.
34. Kim KH, Roberts CW. (2014) Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. Cancer Genet, 207: 365-372.
35. Versteege I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O. (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. Nature, 394: 203-206.
36. Wang X, Haswell JR, Roberts CW. (2014) Molecular pathways: SWI/SNF (BAF) complexes are frequently mutated in cancer--mechanisms and potential therapeutic insights. Clin Cancer Res, 20: 21-27.
37. Kalimuthu SN, Chetty R. (2016) Gene of the month: SMARCB1. J Clin Pathol, 69: 484-489.
38. Hollmann TJ, Hornick JL. (2011) INI1-deficient tumors: diagnostic features and molecular genetics. Am J Surg Pathol, 35: e47-63.
39. Guidi CJ, Sands AT, Zambrowicz BP, Turner TK, Demers DA, Webster W, Smith TW, Imbalzano AN, Jones SN. (2001) Disruption of Ini1 leads to peri-implantation lethality and tumorigenesis in mice. Mol Cell Biol, 21: 3598-3603.
40. Roberts CW, Galusha SA, McMenamin ME, Fletcher CD, Orkin SH. (2000) Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 13796-13800.
41. Reisman D, Glaros S, Thompson EA. (2009) The SWI/SNF complex and cancer. Oncogene, 28: 1653-1668.
42. Chakravadhanula M, Tembe W, Legendre C, Carpentieri D, Liang WS, Bussey KJ, Carpten J, Berens ME, Bhardwaj RD. (2014) Detection of an atypical teratoid rhabdoid brain tumor gene deletion in circulating blood using next-generation sequencing. J Child Neurol, 29: Np81-85.
43. Hasselblatt M, Isken S, Linge A, Eikmeier K, Jeibmann A, Oyen F, Nagel I, Richter J, Bartelheim K, Kordes U, Schneppenheim R, Fruhwald M, Siebert R, Paulus W. (2013) High-resolution genomic analysis suggests the absence of recurrent genomic alterations other than SMARCB1 aberrations in atypical teratoid/rhabdoid tumors. Genes Chromosomes Cancer, 52: 185-190.

44. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortes ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G. (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature, 499: 214-218.

45. Lee RS, Stewart C, Carter SL, Ambrogio L, Cibulskis K, Sougnez C, Lawrence MS, Auclair D, Mora J, Golub TR, Biegel JA, Getz G, Roberts CW. (2012) A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. J Clin Invest, 122: 2983-2988.

46. Masliah-Planchon J, Bieche I, Guinebretiere JM, Bourdeaut F, Delattre O. (2015) SWI/SNF chromatin remodeling and human malignancies. Annu Rev Pathol, 10: 145-171.

47. Roberts CW, Orkin SH. (2004) The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. Nat Rev Cancer, 4: 133-142.

48. Yaniv M. (2014) Chromatin remodeling: from transcription to cancer. Cancer Genet, 207: 352-357.

49. Betz BL, Strobeck MW, Reisman DN, Knudsen ES, Weissman BE. (2002) Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G1 arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB. Oncogene, 21: 5193-5203.

50. Versteege I, Medjkane S, Rouillard D, Delattre O. (2002) A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. Oncogene, 21: 6403-6412.

51. Zhang ZK, Davies KP, Allen J, Zhu L, Pestell RG, Zagzag D, Kalpana GV. (2002) Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. Mol Cell Biol, 22: 5975-5988.

52. Griffin CT, Curtis CD, Davis RB, Muthukumar V, Magnuson T. (2011) The chromatin-remodeling enzyme BRG1 modulates vascular Wnt signaling at two levels. Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 2282-2287.
53. Gadd S, Sredni ST, Huang CC, Perlman EJ. (2010) Rhabdoid tumor: gene expression clues to pathogenesis and potential therapeutic targets. Lab Invest, 90: 724-738.
54. Wang X, Werneck MB, Wilson BG, Kim HJ, Kluk MJ, Thom CS, Wischhusen JW, Evans JA, Jesneck JL, Nguyen P, Sansam CG, Cantor H, Roberts CW. (2011) TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. J Clin Invest, 121: 3834-3845.
55. Lee S, Cimica V, Ramachandra N, Zagzag D, Kalpana GV. (2011) Aurora A is a repressed effector target of the chromatin remodeling protein INI1/hSNF5 required for rhabdoid tumor cell survival. Cancer Res, 71: 3225-3235.
56. Alver BH, Kim KH, Lu P, Wang X, Manchester HE, Wang W, Haswell JR, Park PJ, Roberts CW. (2017) The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. Nat Commun, 8: 14648.
57. Wilson BG, Wang X, Shen X, McKenna ES, Lemieux ME, Cho YJ, Koellhoffer EC, Pomeroy SL, Orkin SH, Roberts CW. (2010) Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. Cancer Cell, 18: 316-328.
58. Pasini D, Di Croce L. (2016) Emerging roles for Polycomb proteins in cancer. Curr Opin Genet Dev, 36: 50-58.
59. Kohashi K, Oda Y. (2017) Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. Cancer Sci, 108: 547-552.
60. Biegel JA, Rorke LB, Emanuel BS. (1989) Monosomy 22 in rhabdoid or atypical teratoid tumors of the brain. N Engl J Med, 321: 906.
61. Eaton KW, Tooke LS, Wainwright LM, Judkins AR, Biegel JA. (2011) Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors. Pediatr Blood Cancer, 56: 7-15.
62. Wilson BG, Roberts CW. (2011) SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. Nat Rev Cancer, 11: 481-492.
63. Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Izumi T, Ohta S, Taguchi T, Suita S, Tsuneyoshi M. (2007) Highly aggressive behavior of malignant rhabdoid tumor: a special reference to SMARCB1/INI1 gene alterations using molecular

genetic analysis including quantitative real-time PCR. J Cancer Res Clin Oncol, 133: 817-824.

64. Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB. (2002) Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. Clin Cancer Res, 8: 3461-3467.

65. Cheng JX, Tretiakova M, Gong C, Mandal S, Krausz T, Taxy JB. (2008) Renal medullary carcinoma: rhabdoid features and the absence of INI1 expression as markers of aggressive behavior. Mod Pathol, 21: 647-652.

66. Modena P, Lualdi E, Facchinetti F, Galli L, Teixeira MR, Pilotti S, Sozzi G. (2005) SMARCB1/INI1 tumor suppressor gene is frequently inactivated in epithelioid sarcomas. Cancer Res, 65: 4012-4019.

67. Chbani L, Guillou L, Terrier P, Decouvelaere AV, Gregoire F, Terrier-Lacombe MJ, Ranchere D, Robin YM, Collin F, Freneaux P, Coindre JM. (2009) Epithelioid sarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 106 cases from the French sarcoma group. Am J Clin Pathol, 131: 222-227.

68. Hornick JL, Dal Cin P, Fletcher CD. (2009) Loss of INI1 expression is characteristic of both conventional and proximal-type epithelioid sarcoma. Am J Surg Pathol, 33: 542-550.

69. Flucke U, Slootweg PJ, Mentzel T, Pauwels P, Hulsebos TJ. (2009) Re: Infrequent SMARCB1/INI1 gene alteration in epithelioid sarcoma: a useful tool in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor: Direct evidence of mutational inactivation of SMARCB1/INI1 in epithelioid sarcoma. Hum Pathol, 40: 1361-1362; author reply 1362-1364.

70. Kohashi K, Izumi T, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Taguchi T, Iwamoto Y, Hasegawa T, Tsuneyoshi M. (2009) Infrequent SMARCB1/INI1 gene alteration in epithelioid sarcoma: a useful tool in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. Hum Pathol, 40: 349-355.

71. Papp G, Krausz T, Stricker TP, Szendroi M, Sapi Z. (2014) SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels. Genes Chromosomes Cancer, 53: 168-176.

72. Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. (2014) Differential microRNA expression profiles between

malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: miR193a-5p is suggested to downregulate SMARCB1 mRNA expression. Mod Pathol, 27: 832-839.

73. Patil S, Perry A, Maccollin M, Dong S, Betensky RA, Yeh TH, Gutmann DH, Stemmer-Rachamimov AO. (2008) Immunohistochemical analysis supports a role for INI1/SMARCB1 in hereditary forms of schwannomas, but not in solitary, sporadic schwannomas. Brain Pathol, 18: 517-519.

74. Hulsebos TJ, Kenter S, Siebers-Renelt U, Hans V, Wesseling P, Flucke U. (2014) SMARCB1 involvement in the development of leiomyoma in a patient with schwannomatosis. Am J Surg Pathol, 38: 421-425.

75. Yamamoto H, Kohashi K, Tsuneyoshi M, Oda Y. (2011) Heterozygosity loss at 22q and lack of INI1 gene mutation in gastrointestinal stromal tumor. Pathobiology, 78: 132-139.

76. Saponara M, Urbini M, Astolfi A, Indio V, Ercolani G, Del Gaudio M, Santini D, Pirini MG, Fiorentino M, Nannini M, Lolli C, Mandrioli A, Gatto L, Brandi G, Biasco G, Pinna AD, Pantaleo MA. (2015) Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFRalpha genotype evaluated by next generation sequencing (NGS). Oncotarget, 6: 42243-42257.

77. Reik W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature, 447: 425-432.

78. Robertson KD, Jones PA. (2000) DNA methylation: past, present and future directions. Carcinogenesis, 21: 461-467.

79. Toh TB, Lim JJ, Chow EK. (2017) Epigenetics in cancer stem cells. Mol Cancer, 16: 29.

80. Strahl BD, Allis CD. (2000) The language of covalent histone modifications. Nature, 403: 41-45.

81. Stallcup MR. (2001) Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. Oncogene, 20: 3014-3020.

82. Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. Cell, 128: 693-705.

83. Bannister AJ, Kouzarides T. (2005) Reversing histone methylation. Nature, 436: 1103-1106.

84. Changchien YC, Tatrai P, Papp G, Sapi J, Fonyad L, Szendroi M, Papai Z, Sapi Z. (2012) Poorly differentiated synovial sarcoma is associated with high expression of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2). J Transl Med, 10: 216.

85. Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. Nat Struct Mol Biol, 11: 1037-1043.
86. Toth K, Brun N, Langowski J. (2006) Chromatin compaction at the mononucleosome level. Biochemistry, 45: 1591-1598.
87. Matarazzo MR, De Bonis ML, Strazzullo M, Cerase A, Ferraro M, Vastarelli P, Ballestar E, Esteller M, Kudo S, D'Esposito M. (2007) Multiple binding of methyl-CpG and polycomb proteins in long-term gene silencing events. J Cell Physiol, 210: 711-719.
88. Esteller M. (2007) Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. Hum Mol Genet, 16 Spec No 1: R50-59.
89. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS. (2008) The eukaryotic genome as an RNA machine. Science, 319: 1787-1789.
90. Dawson MA, Kouzarides T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell, 150: 12-27.
91. Ying SY, Chang CP, Lin SL. (2010) Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. Methods Mol Biol, 629: 205-237.
92. Mohr AM, Mott JL. (2015) Overview of microRNA biology. Semin Liver Dis, 35: 3-11.
93. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. (2016) OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. Cancer Res, 76: 3666-3670.
94. Rupaimoole R, Slack FJ. (2017) MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov, 16: 203-222.
95. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. (2010) OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. Nature, 467: 86-90.
96. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. (2006) A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab, 91: 3584-3591.
97. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 353: 1793-1801.

98. Mitchelson KR, Qin WY. (2015) Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. World J Biol Chem, 6: 162-208.

99. Taulli R, Foglizzo V, Morena D, Coda DM, Ala U, Bersani F, Maestro N, Ponzetto C. (2014) Failure to downregulate the BAF53a subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex contributes to the differentiation block in rhabdomyosarcoma. Oncogene, 33: 2354-2362.

100. Bao YP, Yi Y, Peng LL, Fang J, Liu KB, Li WZ, Luo HS. (2013) Roles of microRNA-206 in osteosarcoma pathogenesis and progression. Asian Pac J Cancer Prev, 14: 3751-3755.

101. Wang CQ, Huang YW, Wang SW, Huang YL, Tsai CH, Zhao YM, Huang BF, Xu GH, Fong YC, Tang CH. (2017) Amphiregulin enhances VEGF-A production in human chondrosarcoma cells and promotes angiogenesis by inhibiting miR-206 via FAK/c-Src/PKCdelta pathway. Cancer Lett, 385: 261-270.

102. Tian R, Liu T, Qiao L, Gao M, Li J. (2015) Decreased serum microRNA-206 level predicts unfavorable prognosis in patients with melanoma. Int J Clin Exp Pathol, 8: 3097-3103.

103. Ge X, Lyu P, Cao Z, Li J, Guo G, Xia W, Gu Y. (2015) Overexpression of miR-206 suppresses glycolysis, proliferation and migration in breast cancer cells via PFKFB3 targeting. Biochem Biophys Res Commun, 463: 1115-1121.

104. Chen QY, Jiao DM, Wu YQ, Chen J, Wang J, Tang XL, Mou H, Hu HZ, Song J, Yan J, Wu LJ, Chen J, Wang Z. (2016) MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway. Oncotarget, 7: 18247-18261.

105. Cui Y, Xie S, Luan J, Zhou X, Han J. (2015) Identification of the receptor tyrosine kinases (RTKs)-oriented functional targets of miR-206 by an antibody-based protein array. FEBS Lett, 589: 2131-2135.

106. Ren XL, He GY, Li XM, Men H, Yi LZ, Lu GF, Xin SN, Wu PX, Li YL, Liao WT, Ding YQ, Liang L. (2016) MicroRNA-206 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting FMNL2. J Cancer Res Clin Oncol, 142: 581-592.

107. Alteri A, De Vito F, Messina G, Pompili M, Calconi A, Visca P, Mottolese M, Presutti C, Grossi M. (2013) Cyclin D1 is a major target of miR-206 in cell differentiation and transformation. Cell Cycle, 12: 3781-3790.

108. Chattopadhyay S, Bielinsky AK. (2007) Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase-alpha and prevents DNA damage during replication. Mol Biol Cell, 18: 4085-4095.
109. Zhang Q, Lu C, Fang T, Wang Y, Hu W, Qiao J, Liu B, Liu J, Chen N, Li M, Zhu R. (2015) Notch3 functions as a regulator of cell self-renewal by interacting with the beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. Oncotarget, 6: 3669-3679.
110. Crepaldi T, Bersani F, Scuoppo C, Accornero P, Prunotto C, Taulli R, Forni PE, Leo C, Chiarle R, Griffiths J, Glass DJ, Ponzetto C. (2007) Conditional activation of MET in differentiated skeletal muscle induces atrophy. J Biol Chem, 282: 6812-6822.
111. Kuo W, Lin J, Tang TK. (2000) Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. Int J Cancer, 85: 857-864.
112. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. (2016) Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. Mol Cancer, 15: 18.
113. Mader S, Pantel K. (2017) Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. Oncol Res Treat, 40: 404-408.
114. Chemi F, Mohan S, Brady G. (2020) Circulating Tumour Cells in Lung Cancer. Recent Results Cancer Res, 215: 105-125.
115. Harle A. (2020) Cell-Free DNA in the Management of Colorectal Cancer. Recent Results Cancer Res, 215: 253-261.
116. Peter M, Magdelenat H, Michon J, Melot T, Oberlin O, Zucker JM, Thomas G, Delattre O. (1995) Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Br J Cancer, 72: 96-100.
117. Przybyl J, Kozak K, Kosela H, Falkowski S, Switaj T, Lugowska I, Szumera-Cieckiewicz A, Ptaszynski K, Grygalewicz B, Chechlinska M, Pienkowska-Grela B, Debiec-Rychter M, Siedlecki JA, Rutkowski P. (2014) Gene expression profiling of peripheral blood cells: new insights into Ewing sarcoma biology and clinical applications. Med Oncol, 31: 109.
118. Krumbholz M, Hellberg J, Steif B, Bauerle T, Gillmann C, Fritscher T, Agaimy A, Frey B, Juengert J, Wardelmann E, Hartmann W, Juergens H, Dirksen U, Metzler M. (2016) Genomic EWSR1 Fusion Sequence as Highly Sensitive and

Dynamic Plasma Tumor Marker in Ewing Sarcoma. Clin Cancer Res, 22: 4356-4365.

119. Hashimoto N, Myoui A, Araki N, Asai T, Sonobe H, Hirota S, Yoshikawa H. (2001) Detection of SYT-SSX fusion gene in peripheral blood from a patient with synovial sarcoma. Am J Surg Pathol, 25: 406-410.

120. Ogino S, Konishi H, Ichikawa D, Hamada J, Shoda K, Arita T, Komatsu S, Shiozaki A, Okamoto K, Yamazaki S, Yasukawa S, Konishi E, Otsuji E. (2018) Detection of fusion gene in cell-free DNA of a gastric synovial sarcoma. World J Gastroenterol, 24: 949-956.

121. Fricke A, Ullrich PV, Cimniak AF, Follo M, Nestel S, Heimrich B, Nazarenko I, Stark GB, Bannasch H, Braig D, Eisenhardt SU. (2016) Synovial Sarcoma Microvesicles Harbor the SYT-SSX Fusion Gene Transcript: Comparison of Different Methods of Detection and Implications in Biomarker Research. Stem Cells Int, 2016: 6146047.

122. Tatrai P, Szepesi A, Matula Z, Szigeti A, Buchan G, Madi A, Uher F, Nemet K. (2012) Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. Biochem Biophys Res Commun, 422: 28-35.

123. Mihaly D, Matula Z, Changchien YC, Papp G, Tatrai P, Sapi Z. (2017) First cloned human immortalized adipose derived mesenchymal stem-cell line with chimeric SS18-SSX1 gene (SS-iASC). Cancer Genet, 216-217: 52-60.

124. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25: 402-408.

125. Vogelstein B, Kinzler KW. (1999) Digital PCR. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 9236-9241.

126. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254.

127. Handgretinger R, Kimmig A, Koscielnak E, Schmidt D, Rudolph G, Wolburg H, Paulus W, Schilbach-Stueckle K, Ottenlinger C, Menrad A, et al. (1990) Establishment and characterization of a cell line (Wa-2) derived from an extrarenal rhabdoid tumor. Cancer Res, 50: 2177-2182.

128. Papp G, Changchien YC, Peterfia B, Pecsenka L, Krausz T, Stricker TP, Khoor A, Donner L, Sapi Z. (2013) SMARCB1 protein and mRNA loss is not caused

by promoter and histone hypermethylation in epithelioid sarcoma. Mod Pathol, 26: 393-403.

129. Barrott JJ, Illum BE, Jin H, Zhu JF, Mosbruger T, Monument MJ, Smith-Fry K, Cable MG, Wang Y, Grossmann AH, Capecchi MR, Jones KB. (2015) beta-catenin stabilization enhances SS18-SSX2-driven synovial sarcomagenesis and blocks the mesenchymal to epithelial transition. Oncotarget, 6: 22758-22766.

130. Cironi L, Provero P, Riggi N, Janiszewska M, Suva D, Suva ML, Kindler V, Stamenkovic I. (2009) Epigenetic features of human mesenchymal stem cells determine their permissiveness for induction of relevant transcriptional changes by SYT-SSX1. PLoS One, 4: e7904.

131. Hayakawa K, Ikeya M, Fukuta M, Woltjen K, Tamaki S, Takahara N, Kato T, Jr., Sato S, Otsuka T, Toguchida J. (2013) Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun, 432: 713-719.

132. Goodwin ML, Jin H, Straessler K, Smith-Fry K, Zhu JF, Monument MJ, Grossmann A, Randall RL, Capecchi MR, Jones KB. (2014) Modeling alveolar soft part sarcomagenesis in the mouse: a role for lactate in the tumor microenvironment. Cancer Cell, 26: 851-862.

133. Cornillie J, van Cann T, Wozniak A, Hompes D, Schoffski P. (2016) Biology and management of clear cell sarcoma: state of the art and future perspectives. Expert Rev Anticancer Ther, 16: 839-845.

134. Mihaly D, Papp G, Mervai Z, Reszegi A, Tatrai P, Szaloki G, Sapi J, Sapi Z. (2018) The oncomir face of microRNA-206: A permanent miR-206 transfection study. Exp Biol Med (Maywood), 243: 1014-1023.

135. Coda DM, Lingua MF, Morena D, Foglizzo V, Bersani F, Ala U, Ponzetto C, Taulli R. (2015) SMYD1 and G6PD modulation are critical events for miR-206-mediated differentiation of rhabdomyosarcoma. Cell Cycle, 14: 1389-1402.

136. Taulli R, Bersani F, Foglizzo V, Linari A, Vigna E, Ladanyi M, Tuschl T, Ponzetto C. (2009) The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. J Clin Invest, 119: 2366-2378.

137. Xiao H, Xiao W, Cao J, Li H, Guan W, Guo X, Chen K, Zheng T, Ye Z, Wang J, Xu H. (2016) miR-206 functions as a novel cell cycle regulator and tumor suppressor in clear-cell renal cell carcinoma. Cancer Lett, 374: 107-116.

138. Song G, Zhang Y, Wang L. (2009) MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation. J Biol Chem, 284: 31921-31927.

139. Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. J Cell Biol, 174: 677-687.

140. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GX, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. (2011) MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. Nat Genet, 43: 854-859.

141. Saito T, Nagai M, Ladanyi M. (2006) SYT-SSX1 and SYT-SSX2 interfere with repression of E-cadherin by snail and slug: a potential mechanism for aberrant mesenchymal to epithelial transition in human synovial sarcoma. Cancer Res, 66: 6919-6927.

142. West DC, Grier HE, Swallow MM, Demetri GD, Granowetter L, Sklar J. (1997) Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. J Clin Oncol, 15: 583-588.

143. Kelly KM, Womer RB, Barr FG. (1996) Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. Cancer, 78: 1320-1327.

144. Mihaly D, Nagy N, Papp G, Papai Z, Sapi Z. (2018) Release of circulating tumor cells and cell-free nucleic acids is an infrequent event in synovial sarcoma: liquid biopsy analysis of 15 patients diagnosed with synovial sarcoma. Diagn Pathol, 13: 81.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Mihaly D**, Nagy N, Papp G, Papai Z, Sapi Z. (2018) Release of circulating tumor cells and cell-free nucleic acids is an infrequent event in synovial sarcoma: liquid biopsy analysis of 15 patients diagnosed with synovial sarcoma. Diagn Pathol, 13: 81.

IF: 2,528

2. **Mihaly D**, Papp G, Mervai Z, Reszegi A, Tatrai P, Szaloki G, Sapi J, Sapi Z. (2018) The oncomir face of microRNA-206: A permanent miR-206 transfection study. Exp Biol Med (Maywood), 243: 1014-1023.

IF: 3, 005

3. **Mihaly D**, Matula Z, Changchien YC, Papp G, Tatrai P, Sapi Z. (2017) First cloned human immortalized adipose derived mesenchymal stem-cell line with chimeric SS18-SSX1 gene (SS-iASC). Cancer Genet, 216-217: 52-60.

IF: 2,396

10.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Papp G, **Mihaly D**, Sapi Z. (2017) Unusual signal patterns of break-apart FISH probes usen in the diagnosis of soft tissue sarcomas. Path Oncol Res, 23: 863-871.

IF: 1,935

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszönni Szüleimnek, Nagyszüleimnek, Családomnak, Férjemnek és Barátaimnak, hogy odaadóan támogattak eddigi pályám során és bármikor számíthattam rájuk.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Sápi Zoltán Professzor Úrnak, aki 2012-ben munkacsoportjába befogadott, megismertetett a patológia tudományával és az évek során támogatott.

Köszönöm Polgár Zoltánné Ilának, aki nélkül nem sajátíthattam volna el a metszés és az immunhisztokémiai festés technikáját.

Köszönöm Dr. Papp Gergőnek, hogy bevezetett a molekuláris biológiai technikák világába, hogy bármilyen kérdésemmel fordulhattam hozzá, hogy mindig türelemmel foglalkozott velem és köszönöm, hogy benne nemcsak kiváló kollégára, hanem jó barátra is leltem.

Köszönöm Matolcsy András Professzor Úrnak, hogy PhD munkámat az Intézetben végezhettem.

Köszönöm Dr. Bödör Csabának, hogy dolgozatom házi bírálatát elvállalta és hasznos javaslataival segítette munkámat.

Köszönöm az I.sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden korábbi és jelenlegi munkatársának, hogy munkámat szerető, jó hangulatú környezetben végezhettem.

Szeretném megköszönni Császár Krisztinának, Egedi Krisztinának és Oláh Julcsinak, hogy bármilyen metodikai kérdésemmel fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Tamási Annának és Paulusz Mónikának az immuncitokémiai festésekben való segítségüket, valamint Győrné Benyó Ilonának a kariogramok értékelésében való segítségét.

Köszönöm Dankó Titanillának és Dr. Sebestyén Annának a sejttenyésztéshez nyújtott tanácsaikat.

Köszönöm Reszegi Andreának, Dr. Mervai Zsoltnak, Dr. Nagy Noéminek és Dr. Gángó Ambrusnak a közös munkát, valamint Dr. Barna Gábornak és Dr. Szalóki Gábornak az áramlási citometriás mérésekben való aktív részvételüket.