

Géneltérések biológiai szerepe és prognosztikai jelentősége humán malignus melanomákban

Vízkeleti Laura

Debreceni Egyetem, Egészségtudományok Doktori Iskola, Debrecen

Témavezető:

Prof. Dr. Balázs Margit

A melanoma okozta halálozások legfőbb oka a metasztázisok megjelenése, mely a túlélésen túl jelentősen csökkenti az alkalmazott terápiák hatékonyságát is. Ezért szükséges olyan biomarkerek felkutatása, melyek hozzájárulnak a melanoma prognózisához, és sikeresen alkalmazhatók a terápiás hatékonyság növelésére. Számos jelátviteli útvonal szerepét bizonyították már a melanoma progressziójában. Ezek közül kiemelkedő jelentőségű a Ras/MAPK útvonal aktivációja. A BRAF- és NRAS-mutációk korai megjelenése mellett fontos, hogy az útvonal egyik fő célmolekulája a sejtciklus G1/S fázis átmenetét szabályozó CCND1. Vizsgálataink egyik részében a CCND1 genetikai és génexpressziós eltéréseit tanulmányoztuk a melanomaprogresszió során, figyelembe véve a BRAF és NRAS gének mutációs státuszát. Eredményeink a CCND1-kópiaszám eltéréseinek szignifikáns összefüggését tárták fel a kedvezőtlen klinikai kimenetellel primer melanomákban, mely összefüggést befolyásolta a BRAF és NRAS gének mutációs státusza a napsugárzásnak való kitettség függvényében. Génexpressziós vizsgálataink során a CCND1 mRNS-szintjének szignifikáns csökkenését figyeltük meg a többszörös áttétképző primer tumorokban, mely korrelációt mutatott mind a BRAF és NRAS mRNS-szintekkel, mind pedig ez utóbbi gének mutációs státuszával. A CCND1 protein fokozott expressziója pedig áttétképzéssel, rövidebb túléléssel és nagyobb Breslow-vastagsággal társult. A CCND1-et kifejező sejtek aránya azonban heterogén eloszlást mutatott, mely befolyásolta a klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggést. Kísérleteinket ezért eltérő biológiai karakterű sejtvonalakon végzett vizsgálatokkal egészítettük ki. Ez alapján a progresszió előrehaladtával a CCND1-expresszió fokozódik, majd az áttétben lecsökken. További célunk volt az array komparatív genomhibridizációs (aCGH) vizsgálatok során gyakori eltérést mutató 7q31-es régió szerepének vizsgálata a melanoma progressziójában. A lókuszt rendkívül géndenz, mely magában foglalja a mutációs forráspontként működő FRA7G fragilis helyet. Ennek környezetében lokalizálódik a fokális adhéziók egy kulcsmolekuláját kódoló TES gén, valamint a membrán-lipidutajok multifunkciós alapköve, a CAV1. Interfázisos FISH-vizsgálataink szignifikáns összefüggést mutattak a 7q31 kópiaszám-eltérései és a kedvezőtlen prognózis között. A CAV1 mRNS-expresszió lecsökkent vastag melanomákban, mely változás fehérjeszinten is tapasztalható volt, míg a TES mRNS-szint csökkenése a többszörös áttétképző primer mintákat jellemezte. Magyar Onkológia 59:268–272, 2015

Kulcsszavak: malignus melanoma, fluoreszcencia *in situ* hibridizáció, szöveti microarray, CCND1-eltérések, 7q31-amplifikáció, CAV1- és TES-expresszió, BRAF- és NRAS-mutáció

Metastatic process accounts for the vast majority of melanoma associated mortality, and also results in difficulties in the effective treatment. Therefore, identification of novel biomarkers could contribute to melanoma prognosis, and may also provide new opportunities for efficient cancer treatment. Several signaling pathways have been identified as key regulators in melanoma progression, including the frequent activation of Ras/MAPK signaling pathway through the mutant BRAF or NRAS genes. Besides,

Levelezési cím: Dr. Vízkeleti Laura, Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Kar, Megelőző Orvostani Intézet,
4028 Debrecen, Kassai út 26. E-mail: laura.vizkeleti@gmail.com

Közlésre érkezett: 2015. január 16. • Elfogadva: 2015. február 20.

alterations of *CCND1* may also be of great importance. The oncogene plays a significant role in the G1/S phase transition of the cell cycle, and its transcriptional activation is primarily carried out by the Ras/MAPK cascade. One of our aims was to determine the genetic and gene expression alterations of *CCND1* during melanoma progression, considering the mutation status of *BRAF* and *NRAS* genes. Analysis of *CCND1* copy number alterations revealed significant association with poor clinical outcome in primary melanomas, which was influenced by the mutation status of *BRAF* or *NRAS* in the term of sun exposure. Regarding gene expression, *CCND1* mRNA level decreased in lesions with multiple metastases and were correlated with both the mRNA levels and mutation status of *BRAF* and *NRAS*. *CCND1* protein expression was associated with Breslow thickness, metastasis formation and shorter survival time. However, the proportion of cells expressing the protein showed a heterogeneous distribution, influencing the association with clinical-pathological parameters. Therefore melanoma cell lines with different biological behavior were also analyzed for protein expression. These experiments revealed an increasing *CCND1* protein level throughout primary cancer progression, which then decreased in the metastasis. The other purpose of our study was to determine the role of 7q31 region in melanoma progression, which was found frequently altered using array comparative genomic hybridization (aCGH). 7q31 is a gene dense locus, including the *FRA7G* fragile site, which serves as a mutation hot spot. In its close vicinity *TES* (focal adhesions) and *CAV1* (lipid rafts) genes are located. Using interphase FISH, significant associations were found between 7q31 copy number alterations and poor clinical outcome. Both mRNA and protein levels of *CAV1* decreased in thick lesions whereas primary melanomas forming multiple metastases were featured by decreased *TES* mRNA level.

Vízkeleti L. Biological role and prognostic significance of genetic alterations in human malignant melanomas. *Hungarian Oncology* 59:268–272, 2015

Keywords: malignant melanoma, fluorescence *in situ* hybridization, tissue microarray, *CCND1* alterations, 7q31 amplification, *CAV1* and *TES* expressions, *BRAF* and *NRAS* mutations

BEVEZETÉS

A heterogén fenotípusú malignus melanomát korai áttétképzés és gyorsan kialakuló terápiarezisztencia jellemzi. A bőrdaganatok okozta halálozások döntő többsége is az áttétes melanomáknak tulajdonítható. Multifaktoriális etiológia jellemzi, számos genetikai és környezeti tényező kölcsönhatása révén alakul ki.

A melanoma nagyfokú genomiális heterogenitásáról ismert. Az eltérő útvonalak érintettsége és a közöttük fellépő interakciók komplexitása azt sugallja, hogy az egyedi genetikai és molekuláris eltérések önmagukban nem rendelkeznek döntő befolyással a betegség kialakulására és progressziójára. Azonban a különböző alterációk halmozódása, a tumorsejt és mikrokörnyezete közötti speciális párbeszéddel együtt már képes eltérő klinikai-biológiai kimenetek kialakítására. Így a molekuláris tulajdonságok figyelembevétele segíthet a jelenleg létező klasszifikációs rendszerek pontosításában, jövőbeni terápiás módszerek kidolgozásában.

Számos jelátviteli útvonal kulcsszerepét bizonyították már *de novo* melanomák progressziójában. Néhány közülük régóta ismert, mint a Ras/MAPK útvonal, mely a tirozinkináz receptor jelátvitel egyik fő célpontja. A jelátviteli út vezető szereppel bír a melanomagenézisben, sejtproliferációban és a sejtek túlélésében egyaránt. Emellett más molekuláris kaszkáddal történő interakció révén tovább segítheti

a tumorgenezist, sejtnövekedést, kemorezisztencia kialakulását, inváziót, migrációt és a sejtciklusszabályozás megváltozását. Leggyakoribb eltérései közé tartozik a BRAFV600 és NRASQ61 kodonok mutációja, mely az útvonal konstans aktiválódását eredményezi.

Előzetes aCGH-tanulmányaink számos kromoszomális régió, mint a 7q31 vagy 11q13 eltéréseinek a melanoma agresszív viselkedésében betöltött szerepére világítottak rá. A 7q31 lókuszt magában foglalja a *FRA7G* törékeny pontot, melynek közvetlen közelében található olyan gének (*CAV1* és *TES*), amik lehetséges célpontjai a tumorgenezis során kialakuló genetikai alterációknak. A *CAV1* a membrán „lipidutajok” fő komponenseként különböző fehérjeinterakciók révén a sejt életének számos aspektusát befolyásolja. A daganatprogresszióban betöltött szerepe azonban vitatott; apoptotikus és anti-apoptotikus hatással egyaránt rendelkezik a daganattípus és stádium függvényében. A *TES* a fokális adhéziók kulcsmolekulájaként befolyásolhatja a tumorsejtek motilitását. A 11q13-as lókuszon található *CCND1* onkogén a sejtciklus G1/S fázis átmenet fő szabályozó molekulája. Transzkripció aktiválása elsősorban tirozinkináz receptorok közvetítésével, a Ras/MAPK jelátviteli kaszkádon keresztül valósul meg. Emellett egyéb citokinek, transzkripció faktorok és extracelluláris mátrix fehérjék PI3K–Akt–mTOR kaszkád stimulációja, valamint a csökkent proteindegradáció szintén hozzájárul a megnövekedett *CCND1*-szinthez. Ezek alapján az új

genetikai alterációk identifikálása és szerepének azonosítása a génextpresszió szabályozásában összehangoltan az epigenetikai folyamatokkal új távlatokat nyithat a daganatellenes terápiában is.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A 7q31-es lókuszt genetikai eltéréseinek vizsgálata interfázisos FISH technikával primer melanoma szöveti mintákban és a kialakult nyirokcsomóáttétekben, valamint különböző biológiai viselkedésű melanoma-sejtvonalakban. A FISH-eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel.

2. A 7q31-en lokalizálódó CAV1 és TES mRNS- és fehérjeszint változásainak meghatározása primer melanomákban és sejtvonalakban qRT-PCR és szöveti microarray-ken végzett immunhisztokémia alkalmazásával. Az expressziós eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel.

3. A 7q31-alterációk és génextpressziós változások közötti kapcsolat vizsgálata.

4. A CCND1 onkogén genetikai eltéréseinek vizsgálata interfázisos FISH technikával. A FISH-eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel, valamint a BRAF- és NRAS-mutációs státusszal.

5. A CCND1 mRNS- és fehérjeexpressziós változások meghatározása primer melanomákban qRT-PCR és szöveti microarray-ken végzett immunhisztokémia alkalmazásával. Az expressziós eredmények összevetése a tumorok klinikopatológiai paramétereivel, valamint a BRAF és NRAS gének expressziós és mutációs státuszával.

MÓDSZEREK

A friss/fagyasztott melanomaszövetek a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájáról származtak. A vizsgálatban szereplő betegek nem kaptak kezelést a primer tumorok sebészeti eltávolítását megelőzően. Kísérleteinket eltérő biológiai karakterű humán melanoma-sejtvonalakon (WM35, WM983A, WM983B, A2058, HT168, HT168-M1 és HT199) végzett vizsgálatokkal is kiegészítettük.

A 7q31-es és 11q13-as régiók gyakori amplifikációját aCGH segítségével mutattuk ki. Az eltérések sejt szintű vizsgálatát, valamint az aCGH-eredmények validálását interfázisos fluoreszcencia *in situ* hibridizációval (FISH) végeztük gyári kettős jelzett próbákat (CEP7/7q31 és CEP11/CCND1) alkalmazva. A kiértékelést két módszerrel végeztük el: (1) kópiaszám-kategorizálás (deléció, látszólagos amplifikáció, kis- és nagymértékű amplifikáció) és (2) kópiaszámindex (CNI) alapján kialakított csoportok ROC görbe analízissel meghatározott „cut-off” értéket alkalmazva.

TaqMan egy lépéses RT-PCR segítségével határoztuk meg a CAV1, TES, BRAF, NRAS és CCND1 mRNS-szinteket. Az adatelemzést Livak módszerrel végeztük, ahol a belső kontroll gén GAPDH, a kalibrátor 3 különböző személytől származó naevusminta, illetve tenyésztett melanocita volt.

A CAV1, TES és CCND1 immunhisztokémiai vizsgálatokat szöveti microarray-ken végeztük. A detektálás Envision/HRP rendszerrel történt VIP peroxidáz szubsztrátot alkalmazva. A reakció pozitivitását 4 fokozatú skálán értékeltük (nincs, gyenge, közepes és erős festődés), valamint a CCND1 esetében a kiértékelést quickscore módszerrel is elvégeztük. A fehérjeexpressziós vizsgálatokat sejtvonalakon végzett Western blot analízissel egészítettük ki. A jel detektálására peroxidázkonjugált másodlagos antitesteket alkalmaztunk, és kemilumineszcenciával tettük láthatóvá. A kész immunblotokat denzitométerrel kvantifikáltuk.

A BRAFV600 és NRASQ61 kodonok mutációs státuszát olvadáspont-analízissel detektáltuk fluoreszcens próbákat alkalmazva. Az így nyert eredményeket a PCR-termékek direkt szekvenálásával erősítettük meg.

Valamennyi statisztikai analízist SPSS 19.0 és R-2.15.0 programcsomagok segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK

A kalkulált 7q31 lókuszt CNI jól korrelált a 7-es kromoszóma kópiaszám-eltéréseivel, és szignifikánsan magasabb volt azon primer daganatokban, melyeket metasztatizáló hajlam és kifehélyesedő felszín jellemezte.

Fokozott CAV1 mRNS-szint volt kimutatható a nagy Breslow-vastagságú daganatokban, míg a TES mRNS-szintek eltérést mutattak a különböző helyen lokalizálódó áttétekkel rendelkező primer tumorokban. Fehérjeszinten a vizsgált naevusminták egyik fehérje esetében sem mutatnak erős pozitívítást. A melanomaszövetek viszont általánosságban erős CAV1-membránfestődés mellett gyenge és diffúz citoplazmái festődést is mutattak, míg a TES fehérje gyakran képzett plakkokat a membránban. Ugyanakkor a CAV1 fehérje a primer melanomák 83%-ában volt csupán detektálható. A fennmaradó minták negatívak voltak. A vizsgált paraméterek közül a vastag melanomák csökkent CAV1-expresszióval voltak jellemezhetőek; fontos azonban megjegyezni, hogy a vékony léziók egy alcsoportja szintén nem mutatott festődést. A TES fehérjét a primer tumorok 76%-a fejezte ki, egyetlen vizsgált klinikai-patológiai paraméterrel sem találtunk azonban szignifikáns összefüggést.

A különböző szintek között végzett korrelációs analízis nem vagy csak gyenge korrelációt mutatott a 7q31-es lókuszt amplifikációja és az itt lokalizálódó CAV1 és TES gének mRNS- és fehérjeexpressziója között.

A kalkulált CCND1 CNI a 7q31-es régióhoz hasonlóan jól korrelált a 11-es kromoszóma kópiaszámával, és szignifikánsan alacsonyabb volt a végtagokon kialakuló és nem ulcerált melanómákban, míg magasabb kópiaszám jellemezte a távoli szervi, illetve többszörös áttétet képző primer daganatokat. A logisztikus regressziós analízis szintén gyakori CCND1-amplifikációt mutatott ki ulcerált felszínű és többszörös áttétképző tumorokban. A kedvezőtlen klinikai kimenetel ismert prediktoraira, mint az ulceráció, Breslow-vastagság és metasztatizáló hajlam való korrekciót követően a CCND1-amplifikált melanómák mintegy 1,6-szer nagyobb eséllyel okozták az egyén betegség-specifikus halálát. Habár ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak, valószínűleg az adatszám növelésével ez megváltozna.

Az általunk vizsgált melanómák 44%-a hordozott mutációt a BRAF 600-as kodonjában. Ezek többségében, közel 90%-ban V600E mutációt jelentettek, és csupán 2 tumorban fordult elő V600K és 1 melanómában V600R mutáció, így ezeket együtt kezeltük. Az NRAS 61-es kodon mutációi ugyanakkor a primer melanómák összesen 15%-ában fordultak elő, az alábbi típusmegoszlásban: 63% Q61K, 25% Q61R és 2% Q61L mutációt hordozó lézió. A BRAF- és NRAS-mutációk egyetlen vizsgált mintában sem fordultak elő együttesen. A mutációt hordozó minták viszonylag alacsony száma és ugyanazon útvonalra gyakorolt azonos hatása miatt a különböző BRAFV600 és NRASQ61 mutációkat együtt kezeltük az analízis során. A CCND1 kópiaszám-eltérései és a BRAF/NRAS-mutációk közötti interakciós vizsgálatok nem mutattak ki semmilyen módosító hatást a CCND1-eltéréseknek a primer melanómák klinikai-patológiai paramétereivel való összefüggéseiben, viszont korrigálva a BRAF- és NRAS-mutációkra, a CCND1-amplifikáció továbbra is összefüggésben állt a felszíni kifehélyesedéssel és a többszörös áttétképzéssel. Továbbá, a CCND1-amplifikációval rendelkező, de BRAF- vagy NRAS-mutációt nem hordozó primer melanómák 4,4-szer gyakrabban alakultak ki krónikus napsugárzásnak kitett bőrfelületeken.

A CCND1 mRNS-expresszió több mint 2-szeres csökkenését a melanómák 39%-ában, míg mRNS-szint-növekedést a vizsgált tumorok csupán 18%-ában mutattuk ki. A gén-kifejeződés és a klinikai-patológiai paraméterek közötti összefüggések analízise rávilágított arra, hogy a CCND1 mRNS-expressziós mintázata primer melanómákban befolyásolhatja az áttétképzés helyét is. Többszörös áttétképző minták ugyanis csökkent CCND1 mRNS-szinttel jellemezhetők, míg a csak kután és/vagy nyirokcsomó-metasztázist képző léziókban fokozott CCND1-expresszió figyelhető meg. Végül, a távoli szervi (tüdő, agy, csont vagy máj) áttéteket képző primer daganatok nem mutattak eltérést a CCND1 mRNS-szintben a kontroll naevusmintákhoz ké-

pest. A CCND1-expressziós változások ugyanakkor közepes mértékű pozitív korrelációt mutattak a BRAF és NRAS mRNS-szintekkel, és szignifikánsan összefüggtek a BRAF és NRAS gének mutációs státuszával is. A fenti mutációkat nem hordozó primer melanómák ugyanis megközelítőleg 2,3-szer nagyobb CCND1 mRNS-expressziós értékekkel rendelkeztek a mutációt hordozó mintákhoz viszonyítva.

A melanómák erős magi festődést és néhány esetben gyenge plazmapozitivitást is mutattak a CCND1 fehérjére. A kiértékelés során csak a magi festődést tekintettük specifikusnak, így a minták 87%-a bizonyult pozitívnak. Nagy intratumorális heterogenitás nem jellemezte a vizsgált mintákat. A CCND1 fehérje kifejeződésének mértéke szignifikánsan összefüggött a Breslow-vastagsággal, áttétképzéssel és a betegek túlélésével. A nagyméretű, metasztázisképző és a beteg halálát okozó primer tumorokat erősebb CCND1-festődés jellemezte, azonban a pozitív sejtek számát is figyelembe véve a tumorvastagsággal való összefüggés eltűnt. Ezért eltérő biológiai viselkedésű humán melanoma-sejtvonalak esetében is meghatároztuk a CCND1 fehérjeszinteket immunhisztokémia és Western blot technikák segítségével. A vizsgálat azt mutatta, hogy a progresszió előrehaladtával a CCND1-expresszió fokozódik, majd az áttétben lecsökken. A Western blot analízis eredményei megerősítették ezen eredményeket.

A különböző szintek közötti összefüggést vizsgálva, a CCND1 fehérje kifejeződésére nem volt szignifikáns hatásal sem az mRNS-szint, sem pedig az átlagos génkópiaszám.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A 7q31 kópiaszám-eltéréseinek primer melanómákban végzett FISH-analízise szignifikáns összefüggést mutatott ki a kedvezőtlen klinikai kimenetellel.

2. A 7q31-es lókuszon elhelyezkedő CAV1 mRNS-expressziós analízise csökkent kifejeződést tárt fel vastag melanómákban, mely eltérés fehérjeszinten is kimutatható volt.

3. A TES mRNS-szint csökkenését többszörös áttétképző primer melanoma mintákban figyeltük meg, míg azok a léziók, melyek csupán kután vagy nyirokcsomó-metasztázissal rendelkeztek, emelkedett mRNS-szinttel jellemezhetők. Ugyanakkor a TES fehérje expressziója nem mutatott összefüggést egyetlen vizsgált paraméterrel sem.

4. A CCND1 gén kópiaszám-eltérései összefüggést mutattak a kedvezőtlen klinikai kimenetellel primer melanómákban. Ezt az összefüggést befolyásolta a BRAF és NRAS gének mutációs státusza a napsugárzásnak való kitettség függvényében.

5. CCND1 mRNS-szint csökkenése figyelhető meg azokban a primer tumorokban, melyek többszörös áttétképzéssel jellemezhetők, és a génextpresszió korrelációt mutat

mind a BRAF és NRAS mRNS-szintekkel, mind pedig ez utóbbi gének mutációs státuszával. Továbbá a CCND1 protein fokozott expressziója áttétképzéssel, rövidebb túléléssel és nagyobb Breslow-tumorvastagsággal társul.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Prof. Dr. Balázs Margitnak*, hogy a daganatkutatás csodálatos világába bevezetett és szakmai tanácsaival segítette PhD-munkámat. Ugyanakkor köszönettel tartozom *Prof. Dr. Ádány Rózának* is, hogy a Megelőző Orvostani Intézetben munkámat lehetővé tette. Külön köszönöm *Dr. Emri Gabriella* és a néhai *Dr. Bégány Ágnes* áldozatos segítségét a melanomaminták szövettani és klinikai értékelésében, dermatopatológiai karakterizálásában, valamint *Koroknai Viktória* és *Kiss Tímea* PhD-hallgatóknak a soha nem szűnő segítőkészséget. Végül külön köszönettel tartozom *Dr. Ecsedi Szilviának*, *Dr. Tóth Rékának* és *Dr. Rákósy Zsuzsának* a szakmai konzultációkért, folyamatos támogatásukért, valamint családomnak és barátaimnak, hogy a nehéz pillanatokban mindig mellettem álltak.

A PhD-tézisekben szereplő publikációk elkészítését és a tézisek összeállítását az MTA-DE Népegészségügyi Kutatócsoport (2011 TKI 473), az OTKA K75191, a TÁMOP-4.2.2.A/11/1/KONV-2012-0031 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Rákósy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, et al. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 121:1729–1737, 2007
2. Rákósy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, et al. Characterization of 9p21 copy number alterations in human melanoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 182:116–121, 2008

3. Ecsedi S, Rákósy Z, Vízkeleti L, et al. Chromosomal imbalances are associated with increased proliferation and might contribute to bone destruction in cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 139:635–640, 2008
4. Lázár V, Ecsedi S, Szollosi AG, et al. Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *Mod Pathol* 22:1367–1378, 2009
5. Kitoh Y, Saio M, Gotoh N, et al. Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic-cell-like signaling in vitro. *Int J Oncol* 38:1409–1419, 2011
6. Balázs M, Ecsedi S, Vízkeleti L, et al. Genomics of human malignant melanoma. In: *Breakthroughs in melanoma research*. Ed. Tanaka Y, In-Tech, Rijeka 2011. pp. 237–263
7. Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákósy Z, et al. Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma. *Front Biosci* 4:1802–1812, 2012
8. Lázár V, Ecsedi S, Vízkeleti L, et al. Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanoma as revealed by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res* 22:202–214, 2012
9. Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákósy Z, et al. The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. *Tumor Biol* 33: 2189–2199, 2012
10. Rákósy Z, Ecsedi S, Toth R, et al. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *PLoS One* 8: e54958, 2013
11. Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Lima CS, et al. DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour. *PLoS One* 9: e96612, 2014
12. Mezey G, Treszl A, Schally AV, et al. Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes. *J Cancer Res Clin Oncol* 140:1641–1649, 2014
13. Szalóki G, Krasznai TZ, Tóth Á, et al. The strong in vivo anti-tumor effect of the UIC2 monoclonal antibody is the combined result of Pgp inhibition and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. *PLoS One* 9: e107875, 2014