

Fej-nyak daganatok genomikai analízise

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

dr. Gombos Katalin

B-149 Daganatok Molekuláris Epidemiológiája Doktori Program

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Kovács L. Gábor

Program és témavezető: Dr. Ember István

Dr. Kiss István



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar, 2016

I. BEVEZETÉS

A fej-nyaki régió a koponyaalap és kulcscsont közötti területet foglalja magában, ezért az itt előforduló daganatok mind lokalizációt tekintve, mind szövettanilag, mind pedig klinikai tünetképzés illetve viselkedés alapján nagyon sokrétűek. A szakirodalomban és a klinikai gyakorlatban is a fej-nyak tumorok kategória kettős entitást jelent. Szűkebb értelemben ide soroljuk a középfül, az orrüreg és az orrmelléküregek, a szájüreg, a garat, a gége daganatait, tágabb értelemben ide tartoznak a pajzsmirigy, mellékpajzsmirigy rosszindulatú elváltozásai, a nyálmirigyek és a régió bőrtumorai is.

I.2. A szájüregi, mesopharynx és hypopharynx daganatok kialakulása

A fej-nyak tumorok 98%-a sporadikusan fordul elő, szekvenciális kialakulást mutat és környezeti tényezők által indukált. A fej-nyak daganatok kialakulásának jelenleg széles körben elfogadott modellje, az úgynevezett *cancer-field* avagy *daganat szöveti szerveződési terület* elmélet. A teljesen ép, egészséges enyhén elszarusodó laphámon, nyálkahártyán több környezeti ártalom eredőjéből, több genetikai változás (például: kromoszóma aberráció, pontmutáció, amplifikáció) jön létre. Ezek a károsodást elszenvedett iniciált sejtek a mucosa stratum basalejában találhatók, melyekből osztódással egy folt lézió (patch) fejlődik ki, amely a megváltozott genetikai állományú sejtek „leánysejtjeit” tartalmazza. Így az eredeti genetikai változásból, klonális expanzió révén létrejön a cancer-field. Ez a terület klinikailag illetve hisztopatológiailag sem mutat eltérést a normál mucosához képest. A cancer-field létrejötté elősegíti az orális prekursor lézió kialakulását. A prekursor lézióban létrejövő további genetikai és epigenetikai változások *in situ* illetve invazív tumor létrejöttét eredményezik. Természetesen a cancer-field újabb, egyidejű prekursor léziók és második primer tumor fejlődését is könnyen elősegítheti.

I.3. A pajzsmirigydaganatok kialakulása

A pajzsmirigy rosszindulatú daganatainak 90%-a follicularis sejtekből, azaz a thyreocytákból indul ki. A rosszindulatú pajzsmirigydaganatok mintegy 70-80%-át a papilláris karcinóma (PTC) adja. A daganat gyakran infiltratív módon növekszik, multicentrikus és gyakran ad nyirokcsomó áttétet. A daganatok 15-20%-a folliculáris karcinóma. A folliculáris karcinóma a benignus adenómához szövettani szempontból nagyon hasonló, a malignitás megítélésében az érinvázio és a daganatok beszűrődése ad támpontot. A folliculáris sejtekből kiinduló daganatok génmutációi fontos szerepet játszanak a különböző szövettani típusú karcinómák kialakulásában, illetve az egymásból történő átalakulásban.

I. CÉLKITŰZÉSEK

II.1. Szájüregi laphámsejtes karcinoma miRNS mintázatának vizsgálata során:

- egy 12 miRNS-t tartalmazó daganatspecifikus biomarker panel összeállítása
- a panel alkalmazásával nyert miRNS expressziós eredményeket a daganat klinikai, szövettani sajátosságaival és a betegek környezeti és életmódbeli etiológiai tényezőivel való összehasonlítása
- lokalizáció-specifikus, daganat stádium- és szöveti grade- specifikus, valamint egyes expozícióra specifikus miRNS kifejeződés mintázat meghatározása

II.2. A szájüregi laphámrákok esetén azonosított miRNS-ek target mRNS molekuláinak expressziós vizsgálata során:

- olyan miRNS-mRNS molekuláris szabályozó modul igazolása amely funkcionális szerepet játszik a gyulladások és a karcinogenezis kapcsolatában

II.3. A meso- és hypopharynx daganatok miRNS mintázatának vizsgálata során:

- egy meghatározott térképbiopsziás mintavételi stratégia szerint a daganatok és a daganatot körülvevő ép nyálkahártya miRNS kifejeződésének mintázatának elemzése
- a daganatot körülvevő morfológiailag ép szövetek miRNS kifejeződési mintázatainak összehasonlításával a tumortól való távolság függvényében a karcinogenezist elősegítő molekuláris szerveződési terület kiterjedésének modellezése

II.4. Pajzsmirigydaganatok expressziós microarray analízise során:

- a korai stádiumú follikuláris jellegű pajzsmirigydaganatok (follikuláris adenoma, follikuláris karcinoma és papilláris karcinoma) mRNS expressziós analízise a teljes humán exomra vonatkozóan, magas denzitású microarray technológia alkalmazásával
- olyan mRNS marker csoport kiválasztása, amely a cytopatológiai döntéshozatalt elősegítheti, hasznosan kiegészítheti

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Mintagyűjtés

III.1.1 Szájüregi daganatok mintagyűjtése: a PTE KK Fogászati és Szájsebészeti Klinikán operált, de neoadjuváns ill. irradiációs kezelésben nem részesült betegek szövetszövetmintáiból származnak. Mintáinkat a szájüregi tumorok esetén a tumorból és a rekonstrukciós lebeny távoli széléből vettük 40 betegtől.

III.1.2. Meso- és hypopharynx laphámrákok mintái: a Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán diagnosztizált és operált betegektől származnak. Mintáinkat egységes eljárás szerint a tumorszélből (0), a daganattól 1 cm-re (1), a daganattól 2cm-re (2) illetve a tumortól legalább 3 cm-re (3) fekvő ép nyálkahártyaszövetből vettük. A miRNS expressziós analízis során összesen 52 szövetszövetmintát vizsgáltunk 13 betegtől, melyből 5 hypopharynx, 8 mesopharynx daganatból származott. A tumor szövetszövetminták kliniko-patológiailag II-es, III-as és IV-es stádiumú laphámsejtes karcinómának feleltek meg.

III.1.3. Pajzsmirigydaganatok mintagyűjtése: A pajzsmirigyszövet minták a Debreceni Egyetemen diagnosztizált és az egyetem I. számú Sebészeti Klinikáján műtött pajzsmirigy tumoros betegek mintáiból származnak. Szövetszöveti vizsgálat alapján a minták három fő típusa: folliculáris adenoma, folliculáris karcinoma és papilláris karcinoma. Kontrollként normál pajzsmirigy szövetszövetet használtunk. Normál pajzsmirigy (No=20), folliculáris adenoma (No=8), folliculáris karcinoma (No=7), papilláris karcinoma (No=10.) A kiválasztott malignus daganatok tumornagyság szerint T1 és T2 N0M0 stádiumnak feleltek meg. A T1 stádiumba tartozott a folliculáris karcinóma minták 85,7%-a és a papilláris karcinómák 80%-a.

III.2. Laboratóriumi feldolgozás

III.2.1. Szájüregi, meso- és hypopharynx és pajzsmirigy tumorok teljes RNS izolálása: a mintákat a műtétet követően azonnal -80 °C-ra fagyasztottuk a laboratóriumi feldolgozásig. A teljes nukleinsav izolálás menetét 60 µg friss fagyasztott szövetszövetmintából kiindulva a Roche High Pure miRNA izolációs kit vegyszereinek felhasználásával és a hozzá tartozó használati útmutatónak megfelelően végeztük. A kinyert teljes szövetszöveti (tc) RNS minőségét abszorpciós fotometriával (Maestro Nano spektrofotométer, Maestrogen, Hsinchu, Taiwan) ellenőriztük (260/280 nm A>1,9).

III.2.2. Reverz transzkripció: A tcRNS-t reverz transzkripcióval írtuk át cDNS-re melyhez Universal cDNA synthesis kitet (Quiagen, Woburn, MA, USA) használtunk minden esetben a kitben szereplő random hexamer primer alkalmazásával. A reverz transzkripcióhoz egységesen 5 nanomol/μl koncentrációnak megfelelően hígítottuk az izolált tcRNS-t. Az egyszálú cDNS minőségi ellenőrzését 1%-os agaróz gélelektroforézissel végeztük.

III.2.3. Quantitatív real-time PCR: A tcRNS-ről átírt cDNS mintákat quantitatív PCR rendszerben (Roche LC480 rendszer és LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit, Roche) amplifikáltuk. Az általunk vizsgált miRNS-eknek megfelelően specifikus primereket használtunk a Universal miCURY LNA primer setből (Exiqon, Vedbaek, Dánia) szájuégi minták esetén hsa-miR-21, -155, -191, -146^a, -221 és hsa-miR-222 specifikus primereket valamint saját tervezésű hsa-miR-21, -27a, -34a, -143, -146a, -148a, -155, -221 és -223 specifikus primereket alkalmaztunk (TIB MOLBIOL, Gyál, Magyarország). Meso- és hypopharynx minták esetén hsa-miR-21, -27a, -34a, -143, -146a, -148a, -155, és -221-nek megfelelően a megfelelően saját tervezésű specifikus primereket (TIB MOLBIOL, Gyál, Magyarország) használtunk a továbbiakban megadott szekvenciákkal. Referencia kontrollként mindkét esetben az 5s rRNS és U6 snRNS-nek megfelelő specifikus primereket használtuk a Universal miCURY LNA primer készletből (Exiqon, Vedbaek, Dánia). Az amplifikáció 8x12-es plate-en történt, az általunk tervezett forma szerint: PCR futásonként a plate 6 daganatspecifikus miRNS-t és 2 belső kontrollt tartalmazott, melyeket 10 ismeretlen nukleinsav koncentrációjú mintán, egy sor ismert koncentrációjú pozitív mintán és egy sor negatív kontrollal szemben (templát cDNS helyett vizet tartalmazott a reakcióoldat) vizsgáltunk.

*A target mRNS expresszió vizsgálatára a Roche Ready-To-Use Custom Panelt (Roche, Mannheim, Németország) alkalmaztuk, melyre a következő gének mRNS termékére specifikus primert választottuk ki: tumor nekrozis faktor α interacting protein 1 (*Tnip1*), vascular cell adhesion molecule (*Vcam*), nukleáris faktor kappa B 1 és 2 (*Nfkb1*, *Nfkb2*), Toll-like receptor-1 (*Tlr1*) és inhibitor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase γ (*Ikbkg*). Referencia génként a plate-en a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (*Gapdh*) és a hypoxantin foszforibozil transzferáz (*Hprt1*) szerepeltek, génspecifikus primer szekvenciák a Universal Probe Libraryben elérhetők (UPL/ roche-applied-science.com). Pozitív kontrollként a β -actin szerepelt. A reakciósorozatot technológiai duplikátummal végeztük, az expressziós fluoreszcens jelintenzitás értékeket átlagának megfelelően normalizáltunk.*

III.2.4. Microarray vizsgálat

A microarray vizsgálat az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Funkcionális Genomikai Laboratóriumában történt. Magas denzitású array létrehozásához 20000 humán génspecifikus oligonukleotidot (Sigma –Operon) reszuszpendáltunk, majd 300fmol/μl koncentrációban PXM oligonucleotid lemezekre (Full Moon Biosystems, Sunnyvale, CA, USA) fixáltunk

MicroGrid Total Array System spotter (Biorobotics, Cambridge, UK) segítségével tetraspot elrendezésben. A DNS lemezhez való fixálását 700mJ energiájú UV fényel végeztük (Startalinker, Stratagene, La Jolla, CA).

A vizsgálandó minta előkészítése, hibridizáció. Az egyes szövetmintákból kinyert teljes RNS 2µg-nyi mennyiségéből reverz transzkripciót végeztünk polydT primer tartalmú Genisphere expression Array 900 Detection system (Genisphere, Hatfield, PA, USA) felhasználásával. Mind az első lépés- a cDNS hibridizáció, mind a második lépés a jelölő hibridizáció Ventana hibridizációs kamrában történt „antibody” protokoll szerint.

Scanning és az adatok kiértékelése. Minden array scannelése zöld (543nm- Cy3) illetve vörös (633nm –Cy5) lézertény alatt történt Scan Array Lite 10µm felbontóképességű konfokális fluorescens scannerrel (Gsilumonics, Billerica, MA). A kapott mintázatok kiértékelése a GenePix Pro5.0 software-t (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) használtuk. Az egyes spotok meghatározása automatikus pozicionálással történt.

Az elkészült arrayk validációját real-time PCR módszerrel végeztük, RotoGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia), génspecifikus primerek valamint SybrGreen 1 kit (Roche, Mannheim, Germany) használatával a felhasználási protokoll szerint. A kapott relatív expressziós értékeket két housekeeping gén a glyceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) ill. a hypoxantin foszforiboziltranszferáz (HPRT) gének geometriai átlagának megfelelően normalizáltuk. Az expressziós értékeket Plaffl-módszer segítségével határoztuk meg.

III.2.5. Statisztikai analízis

A szájrégi, meso- és hypopharynx daganatoknál real time PCR során kapott expressziós értékeket az LC480-as PCR gépen a LightCyclerExor 4.0 szoftver segítségével a referencia gén expressziójához viszonyítva relatív kvantifikációs analízissel számoltuk ki ($\Delta\Delta C_p$ módszerrel). A kapott relatív kvantifikációs arányszámokat kétszélű kétmintás t-próbával, receiver operating curve (ROC) analízissel, general linear models (GLM) valamint többváltozós logisztikus regressziós analízissel elemeztük SPSS 21.0 szoftver segítségével.

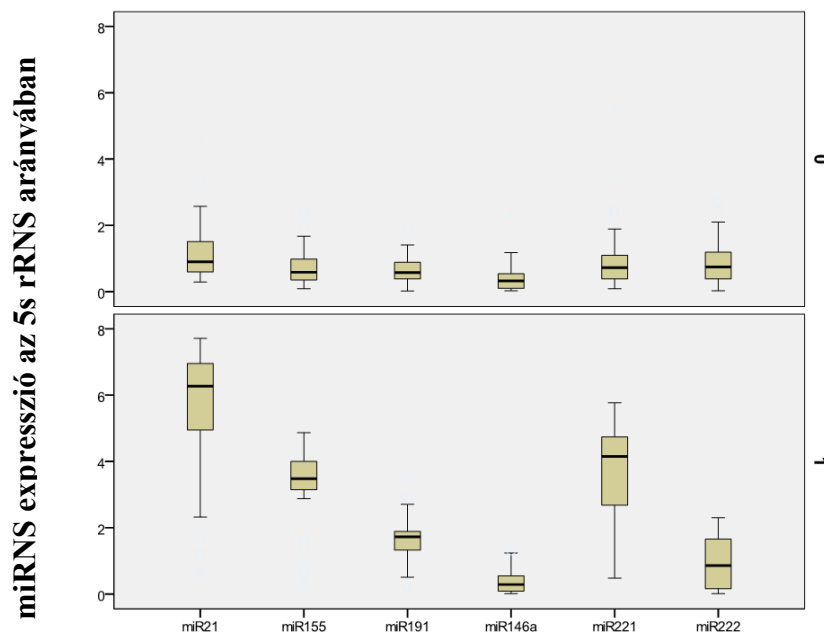
A pajzsmirigydaganatok microarray expressziós profil értékelésénél az array háttérre korigált expressziós adatait vettük figyelembe, mely alapján technikai replikátumok átlagértékei alapján határoztuk meg az egyes génekre vonatkozó expressziós értékeket. Statisztikailag szignifikáns kifejeződésnek az egyes minták logaritmikus eltéréseinek átlagának a normális kétszeresét meghaladó értéket vettük. Normál pajzsmirigyszövetet használva kontrollként, a legalább kétszeres génextpresszió változásokat mutató géneket választottuk ki. A kiválasztott géneket az egyes szövettani diagnózisok alapján válogattuk szét, függetlenül attól, hogy csökkent expresszióról, fokozott expresszióról volt-e szó, valamint a különböző tumorok esetén azonosan megjelenő génextpresszió eltéréseket is meghatároztuk.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Szájüregi daganatok és a normál nyálkahártya miRNS mintázatának összehasonlító vizsgálata

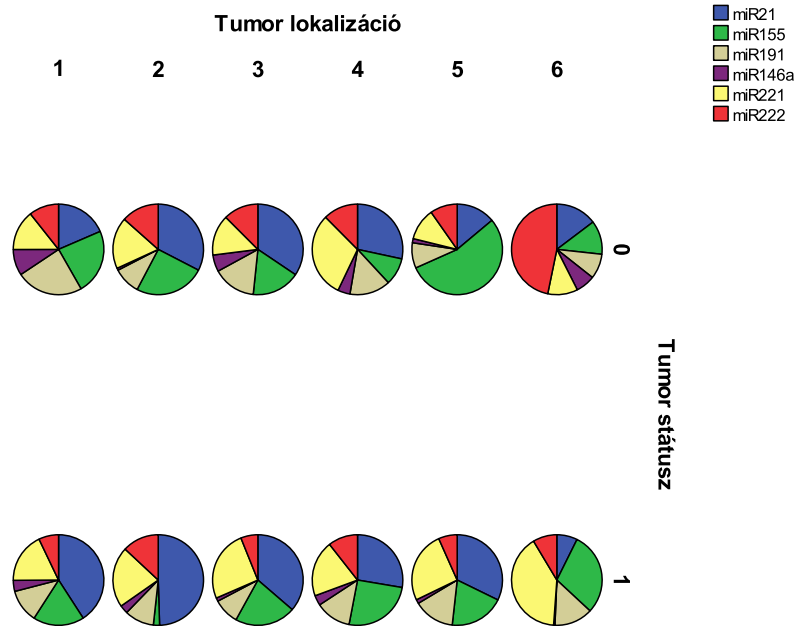
1. vizsgálatsorozat

A szájüregi daganatok és a daganattól távoli ép autológ *normál mucosalis epithelium miRNS expressziós profiljának* összehasonlítása során kapott eredményeket az 1. ábra mutatja be.



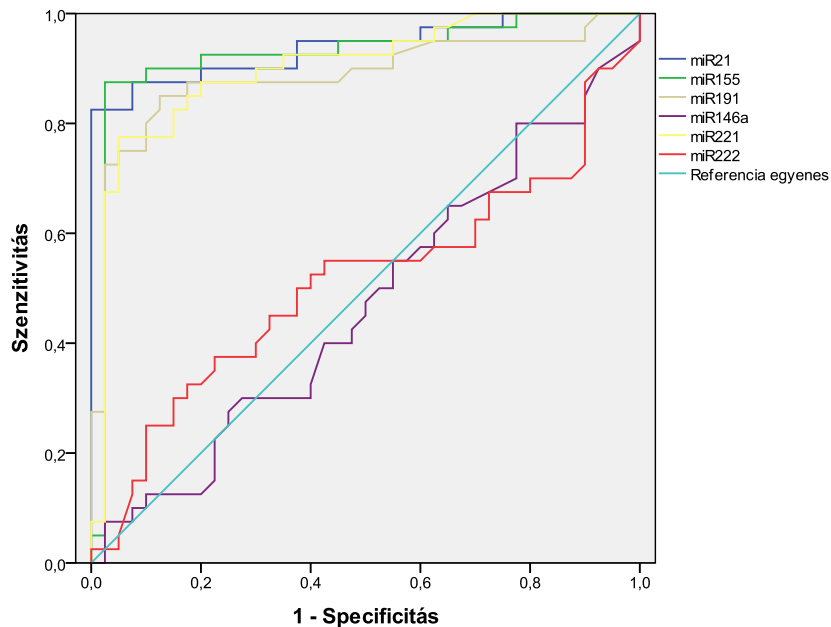
1. ábra: A szájüregi laphámsejtes carcinoma (1) és az autológ normál szövetek (0) miRNS expressziós eltérései. A vizsgált miRNS-ek expressziós értékei az 5s referencia gén relatív kvantifikációs arányában.

Minden vizsgált miRNS esetén fokozott kifejeződést találtunk a daganatszövetekben a kontroll szövetekhez képest, mely statisztikailag szignifikánsnak a miR-21, -155, -191 és -221 esetén igazolódott. A legmagasabb expressziós értékeket a miR-21, -155, és miR-221-nél találtuk, a miR-146a pedig nagyon alacsony mértékben volt jelen a daganatos és ép mintákban egyaránt. A legmarkánsabban elkülönülő expressziós különbséget daganatok és tumorszövetek között a miR-155 esetében találtuk. A miRNS mintázat adott lokalizációjú mintákon egymásra vonatkoztatott arányait (2. ábra) tekintve hasonlóságokat mutattak a daganatok esetén az ajkak, a nyelv, a szájfénék és a gingiva szövetein. Nagyobb eltéréseket az expresszió arányaiban a bucca és a szájpad minták mutattak, előbbiben az összes expresszió felét a miR-21 adta, míg a szájpad lokalizációjú mintákban a miR-221/-155 expresszió dominál. Ép nyálkahártya esetén minden lokalizációban eltérő mintázatot látunk.



2. ábra: A szájüregi daganatok (1) és normál szövetek (0) közötti eltérések a miRNS expresszió egymásra vonatkoztatott arányában, tumorlokalizáció szerint (1:ajak, 2:bucca, 3:nyelv, 4:szájfenék, 5:gingiva, 6:szájpad)

A szájüregi daganatok miRNS expressziós mintázata a ROC analízis során 90% vagy a feletti teszt hatékonyságot mutatott a miR-21, -155 és -221 vonatkozásában (3. ábra)



3. ábra: A vizsgált miRNS-ek receiver operating görbe (ROC) analízise

2. vizsgálatsorozat

A szájúregi daganatok és autológ kontroll nyálkahártya szövetek miRNS expressziós analízisét elvégeztük egy nagyobb számú, saját tervezésű primer szettel is. Mivel ebben az esetben 6 helyett 12 miRNS-t vizsgáltunk, részletgazdagabb aránybeli eltolódásokat figyelhettünk meg a daganatok egyes lokalizációiban. Hasonlóságokat a nyelvgyök és szájfenei daganatok mintázatában lehetett észlelni, a többi lokalizáció nagyon eltérő miRNS arányokat mutatott. Normál szövetek ebben az esetben is markáns eltéréseket mutattak a lokalizációnak megfelelően.

Vizsgálatainkat kiegészítettük egy epidemiológiai és klinikai adatokat a miRNS kifejeződés értékeivel összehasonlító analízissel. Ebben figyelembe vettük a beteg neme, kora, a daganat lokalizációja, TNM tumor s, szövettani grade, tumor méret, nyirokcsomó metasztázis és a recidíva előfordulásának összefüggéseiben vizsgáltuk a miRNS expresszió eredményeit többváltozós regresszió segítségével. A miRNS mintázat a legjelentősebb eltéréseket a daganat lokalizáció, nem, kor, daganat tumor s és szövettani grade összefüggésében mutatta. Az összes változó együttes figyelembevételkor a statisztikailag szignifikánsnak mutakozó miRNS-ek a miR-34a, -143, -146a és -155 voltak.

Általánosított lineáris modell (GLM) alkalmazásával a daganat szövettani grade-jével szignifikáns összefüggést mutatott a miR34a, -143, -196a valamint a miR-223 expresszió. TNM státusszal szignifikáns összefüggést mutatott a miR-155, a tumor méretével a miR-93 kifejeződés, nyirokcsomó metasztázissal szignifikánsan pedig a miR-205 expresszió kapcsolódott.

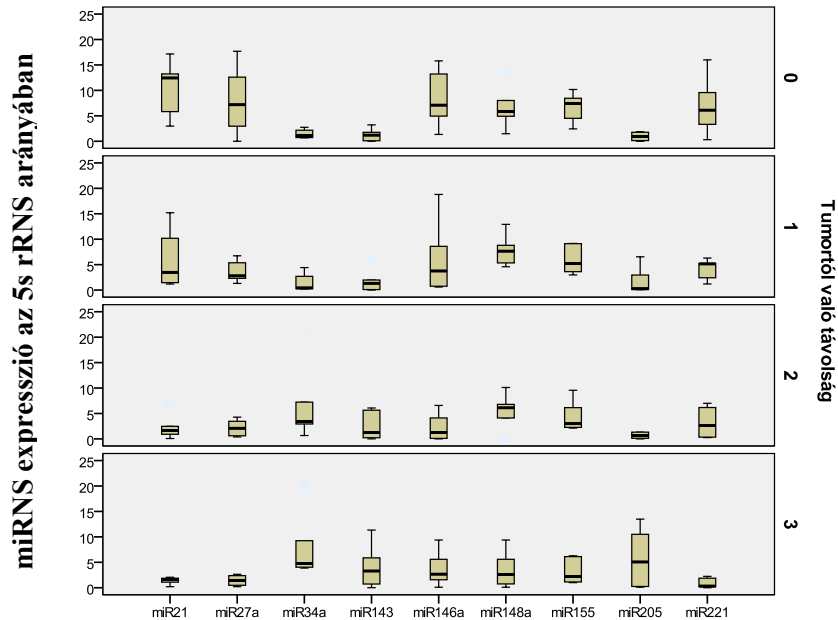
IV.2. Szájüregi daganatok mRNS expressziója

A vizsgálatban párosított kétszélű kétmintás t-próba alkalmazásával a vaszkuláris sejtadhéziós molekula (*Vcam*, $p=0,50$) és a toll like receptor 1 (*Tlr1*, $p=0,27$) mRNS kifejeződése mutatott szignifikánsan emelkedett expressziót a daganatos szövetekben az autológ normál szövetekkel történő összehasonlításban. A szignifikáns expresszió eltérést mutató *Tlr1* a klasszikus NF κ B aktivációs útvonal receptorális serkentésének mediátora, míg a *Vcam* az *Nfkb1* downstream targeteként szerepel a génhálózatban.

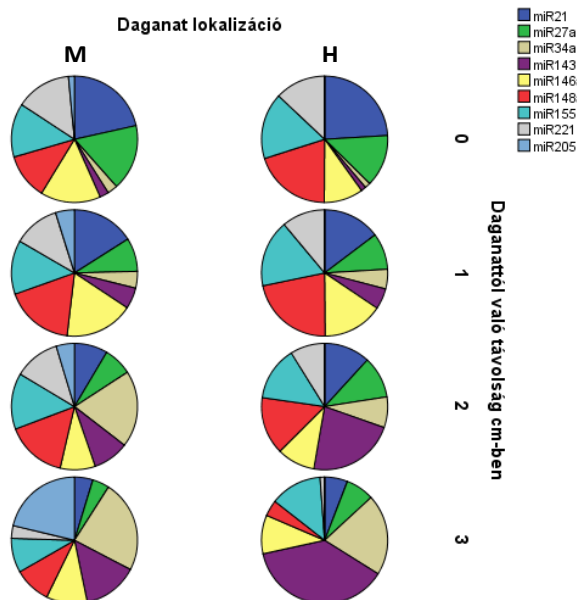
IV.3. Meso- és hypopharynx daganatok térképbiopsziás mintáinak miRNS expressziós analízise

A meso- és hypopharynx daganatok vizsgálat sorozatában a tumorok és az általunk kidolgozott térképbiopsziás séma szerinti mikroszkóposan ép nyálkahártya területekről vett szövetminták egymással történő miRNS expresszióinak összehasonlítását végeztük (4.ábra). A daganathoz képest attól centiméterenként távolodva az ép nyálkahártya szövetekben jellegzetes miRNS kifejeződési mintázatot találtunk a tumortól való távolság függvényében. A daganatszövetek és az 1 cm-re eső peritumorális makroszkóposan ép nyálkahártya szövetek közt szignifikáns expressziós eltérést csupán 3 miRNS, a miR-21, -27a és 221 esetén találtunk. A tumortól 2cm-re eső nyálkahártyához képest a daganatokban fokozott kifejeződése a miR-21, -27a, -146a, és -155-nek volt ugyanakkor a miR-34a és -143 szintje

szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A tumor és a tőle 3 cm-re fekvő nyálkahártya már szignifikáns különbséget mutatott a miR-205 kivételével az összes vizsgált miRNS vonatkozásában, melyeknek a miR-34a és -143 kivételével a daganatokban volt emelkedett expressziójuk.



4. *ábra:* A miRNS expresszió 5s rRNS referencia gén tumor kvantifikációs arányában kifejezett értékei a meso- és hypopharynx daganatokban és a daganatokat körülvevő ép nyálkahártya szövetekben. (0: tumor, 1: tumortól 1 cm-re, 2: tumortól 2 cm-re, 3: tumortól 3 cm távolságra levő ép nyálkahártya)



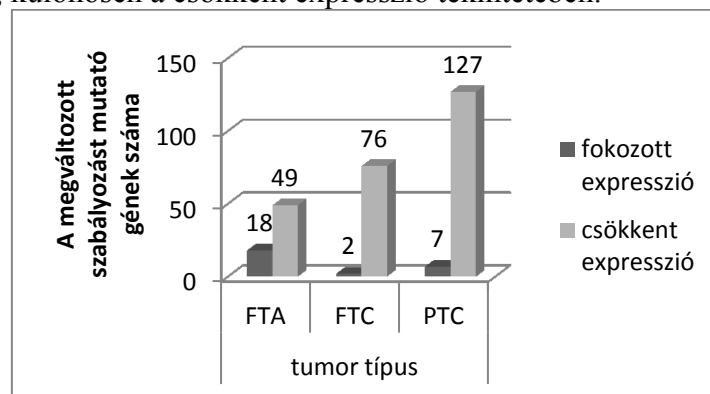
5. *ábra:* A meso-(M) és hypopharynx (H) lokalizációjú daganatok vizsgált miRNS egymáshoz viszonyított aránya a daganattól való távolság függvényében.

A miRNS kifejeződés mintázata az egymásra vonatkoztatott kifejeződés arányában mindkét lokalizációban hasonló tumorszöveti miRNS aránybeli összetételt mutatott (5. ábra). A hasonlóság a tumortól 1 cm-re fekvő területek és tumoros szövetek közt is fennállt, mindkét lokalizáció esetén. Jelentősebb különbség a daganatszövetektől először 2 cm távolságban látható. Ez mesopharynx daganatok esetén a miR-21 és -155 csökkenés és tumorszuppresszor (miR-34a, -143) kifejeződési aránybeli növekedésében jelent meg, míg hypopharynx daganatoknál a tumorszuppresszor (miR-34a és miR-143) és gyulladáshoz köthető mediátor miRNS (miR-146a) valamint a miR-148a közötti arányok megváltozásánál. A távolabbi (3-cm-re levő) ép szövetek, a szájüregi mintákhoz hasonlóan, már a tumorközeli szövetektől és lokalizáció szerint is nagyon erős aránybeli eltéréseket mutattak.

A mesopharynx és hypopharynx minták miRNS expressziós adatait logisztikus regresszióval (I. táblázat) összehasonlítva a két lokalizáció között szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a miR-21, miR-143 és miR155 vonatkozásában. Ezek a miRNS-ek a hypopharynxból származó mintákban szignifikánsan magasabb expressziós értékeket mutattak ($p < 0,05$).

IV. 4. Pajzsmirigy microarray vizsgálat eredményei:

Vizsgálataink során 233 gén csökkent expresszióját és 25 gén fokozott expresszióját sikerült kimutatni a statisztikailag szignifikáns határérték felett normál pajzsmirigyhez viszonyítva. A mintákban kifejezettebben jelentkezett az expresszió csökkenés, bár számos gén fokozott expressziója is megfigyelhető volt. Az egyes szövettani altípusok jellegzetes génexpressziós mintákat mutattak, különösen a csökkent expresszió tekintetében.



6. ábra: A vizsgált pajzsmirigydaganatcsoportokban észlelt szignifikáns expressziós eltérést tumor gének egymáshoz viszonyított számbeli aránya.

Az egyes altípusok differenciáltsági foka és metasztatikus képességével arányosan az alulexpresszált gének száma jelentős növekedést mutatott, míg a fokozott kifejeződést mutató gének száma alacsonyabb mértékű volt (6. ábra).

Külön figyelmet fordítottunk azon gének meghatározására, amelyek több altípusra voltak jellemzők. A vizsgálatok során közös géneket döntő többségében a csökkent expressziókban tudtunk azonosítani. A fokozott expressziót tumor gének között átfedést az egyes szövettani csoportoknál tumor a follikuláris adenoma és follikuláris karcinoma esetében az NFκB gén tekintetében találtunk. A I-III. táblázatok az egyes szövettani alcsoportok szignifikáns eltérést mutató génextpresszióit tüntetik fel.

ID	Név	log. hányados	p érték
Follikuláris adenoma (FA)			
AB044385_1	Transmembrane molecule with thrombospondin module	2.225	0.001
AF152323_1	Protocadherin gamma A3	2.417	<0.05
AF387908_1	MHC class I antigen	2.087	0.010
BC000814_1	TG-interacting factor (tale family homeobox)	2.263	<0.05
BC003382_1	Sorting nexin 2	2.166	0.006
BC011027_1	Ectodysplasin A isoform 1 EDA1	2.285	0.001
NM031942_1	Cell division cycle associated protein 7 isoform 1	2.167	0.009
NM080798_1	Alpha 1 type XIII collagen isoform 2	2.460	<0.05
XM012425_1	Lysyl oxidase-like 1	2.196	<0.05
XM030577_1	Potential phospholipid-transporting ATPase Iia	2.203	0.001
XM051590_1	Nuclear pore protein GP210 precursor	2.004	<0.05
Follikuláris adenoma (FA)/ Follikuláris carcinoma (FTC)			
XM166349_1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, NFKB	3.426/2.066	0.021/0.007
Follikuláris carcinoma (FTC)			
XM170650_1	Riken cDNA 4921522e24	2.237	0.016
Papilláris carcinoma (PTC)			
AB083586_1	Putative G-protein coupled receptor	2.576	<0.05
AJ250014_1	Cyclin D1, CYLD1	2.235	<0.05
BC015753_1	GRO2 oncogene	2.088	<0.05
D89501_1	Salivary proline rich protein P-B, PB1	2.279	0.023
K03208_1	Proline rich protein BstNI subfamily, PRB2	2.166	0.001

I. táblázat: Fokozott kifejeződést tumor gének az egyes pajzsmirigydagánat csoportokban

ID	Név	log. hányados	p érték	log. hányados	p érték
		FTA		FTC	
AF153762_1	Bruton's tyrosine kinase, BTK	-2.025	0.0075	-2.661	0.0140
AF208694_1	Impact	-2.594	0.0013	-2.689	0.0001
BC011634_1	G protein-coupled receptor 30, GPR30	-3.429	0.0004	-2.138	0.0420
BC021104_1	Apelin	-2.024	0.0011	-2.162	0.0280
M55513_1	Potassium channel protein	-2.396	0.0001	-3.810	0.0007
NM_016279_1	E-cadherin	-2.197	0.0001	-2.048	0.0416
NM_145752_1	CDP-diacylglycerol-inositol 3- phosphatidyl-transferase isoform 2	-3.327	0.0002	-2.854	0.0001
		FTA		PTC	
BC002530_1	ADP-ribosylation factor-like 2, ARL2	-2.016	<0,05	-2.525	0.0086
NM_000946_1	Primase, polypeptide 1 (49kd); PRIM1	-2.160	<0,05	-3.368	0.0004
NM_001559_1	Interleukin 12 receptor, beta 2,IL12RB2	-3.000	<0,05	-2.593	0.0087
NM_002076_1	Glucosamine (N-acetyl)-6- sulfatase precursor	-2.567	<0,05	-3.140	0.0003
NM_006298_1	Zinc finger protein 192, ZNF192	-2.003	<0,05	-2.037	0.0411
NM_006484_1	Dual-specificity tyrosine-(y)- phosphorylation regulated kinase 1b isoform c	-2.050	<0,05	-2.870	0.0008
XM_007868_1	Sodium/hydrogen exchanger 5 (Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ exchanger 5), NHE-5	-2.655	<0,05	-2.644	0.0071
		FTC		PTC	
AF052510_1	Phosphocholine cytidyltransferase b	-2.562	0.0001	-2.123	0.0156
AF107044_1	DNA-binding protein,SOX21	-2.488	0.0010	-2.876	0.0075
AK091478_1	NIL-2-a zinc finger protein	-2.260	0.0004	-2.090	0.0051
NM_002662_1	Phospholipase d1, phosphatidylcholine-specific; PLD1	-2.001	0.0001	-2.742	0.0005
NM_002753_1	Mitogen-activated protein kinase 10, isoform 1; MAPK10	-2.277	0.0002	-2.214	0.0092
NM_003691_1	Serine/threonine kinase 16, STK16	-2.250	0.0010	-3.074	0.0033
NM_005251_1	Forkhead box C2, FOXC2	-2.351	0.0012	-3.124	0.0001

II. táblázat: Az egyes pajzsmirigydagánat csoportok között átfedést tumor , szignifikánsan csökkent kifejeződést tumor gének

		FTA		FTC		PTC	
ID	Név	log. hányados	p érték	log. hányados	p érték	log. hányados	p érték
AF140630_1	Urotensin-II	-2.264	0.004	-4.106	0.001	-2.46	0.001
AF294009_1	Eosinophil-derived neurotoxin, RNS2	-2.113	0.024	-2.872	0.001	-2.501	0.014
AF308819_1	Nuclear receptor-interacting factor, PPARG	-2.647	0.001	-2.418	0.029	-2.371	0.001

III. táblázat: Mindhárom pajzsmirigydagantat típusnál szignifikáns csökkenést tumor gének

V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

V.1 Szájüregi, meso-és hypopharynx daganatok eredményeinek megbeszélése

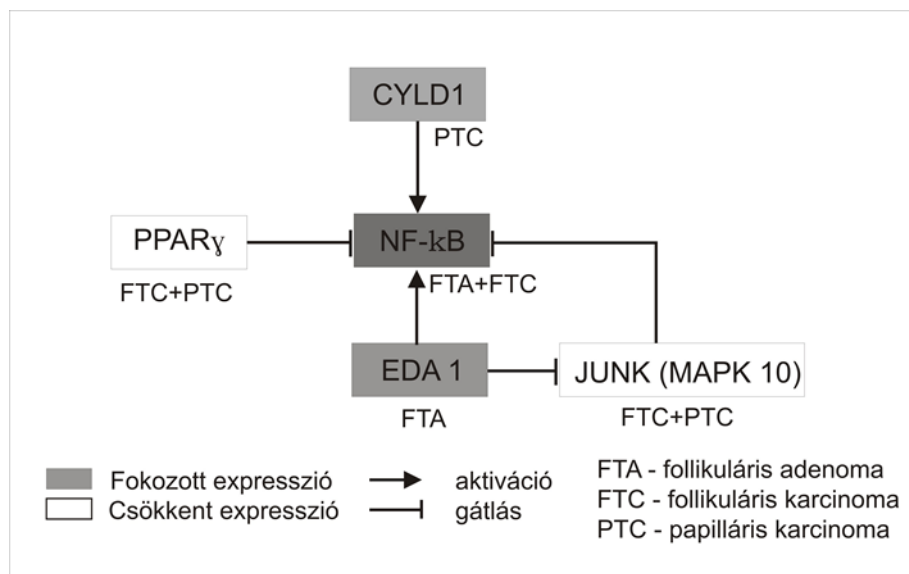
Hazánk egyik kiemelkedő népegészségügyi problémáját jelentik a fej-nyak daganatok. Ennek oka a daganatok késői stádiumban való felismerése, mely a megfelelő prevenciók stratégiák alkalmazásának elégtelenségéből, hiányából fakad. A multimodális daganatterápiás eszköztár fejlesztése mellett elterjedt törekvés a daganatok molekuláris jellemzőinek meghatározása. Kutatásunk során olyan új lehetőségeket kerestünk, mellyel a fej-nyak daganatok szöveti területen alapuló szerveződése molekuláris módszerrel modellezhető, így a különböző szempontok (lokalizáció, klinikai stádium, grade, etiológiai tényezők, szövettani alcsoportok) szerint csoportosított daganatok összehasonlíthatóvá válnak.

A genomikai és epigenetikai tényezők között is fontos szerepet játszó szabályozó kismolekulák, a miRNS-ek funkcionális vizsgálatával sikerült olyan markereket azonosítanunk, amelyek elég érzékenyek és specifikusnak mutatkoztak a daganatos és daganat körüli fenotípusosan ép szövetek jelzésére és azok megkülönböztetésére a távolabb eső molekuláris szabályozás szintjén is ép nyálkahártya szövetektől. Ez megteremtheti a jövőben egy olyan daganatra specifikus biomarker panel kifejlesztését, amely magas kockázatú egyének és a daganat teljes kimetszésén átesett, gyógyult betegek követéses vizsgálatának hasznos részeként szolgálhat. Az általunk talált miRNS eltérések stádium, grade és lokalizáció szempontjából is specifikusak voltak, valamint érzékenyen változott egymáshoz viszonyított arányuk a daganatszövetektől való távolság függvényében. Változásaik kimutatható, a daganat neovaszkularizáció és immortalizációban szerepet játszó target mRNS expressziós változással is összefüggtek. Ezen megfigyelések alapján a fej-nyak daganatok területi szerveződésére a karcinogenezisük funkcionális keresztmetszeti képére is

rávilágíthatunk. Ez a későbbiekben hasznosan kiegészítheti a szövettani diagnosztikát és OPL esetén alkalmazva daganatok elsődleges megelőzését is.

V.2. A pajzsmirigydaganatok microarray expressziós eredményeinek megbeszélése

A fej-nyak daganatok speciális csoportját képező pajzsmirigydaganatok a genomikai analízis szempontjából előnyösen vizsgálható csoportot jelentenek. Könnyű mintavételi lehetőség nyílik a daganatkialakulás és fejlődés bármely fázisában. A daganatok kialakulásának mechanizmusa is, mely viszonylag kevés driver mutációhoz kötött, erősen eltér a laphám eredetű tumorokétól, ezért még a különböző szöveti entitások között is sok közös genomszintű eltérés mutatkozott. Meghatároztuk az egyes noduláris pajzsmirigydaganat csoportoknak megfelelő szignifikáns mRNS expressziós eltéréseket a normál szövethez képest. A daganatokban a malignitás mértékével párhuzamosan kimutatható volt a szignifikánsan csökkent kifejeződést mutató gének magasabb aránya. Meghatároztuk az egyes szövettani csoportok közötti átfedést mutató expressziós eltéréseket és a közösen szabályozott jelátviteli útvonalat. Ennek kulcselemeként azonosítottuk az NF κ B gént és a hozzá kapcsolódó PPAR γ , CYLD1, EDA valamint JNK apoptózist valamint szöveti architektúrát szabályozó hálózatot (7. ábra).



7. ábra: A pajzsmirigydaganatok különböző szövettani típusainál észlelt génexpressziós eltérések és azok összefüggései

Az emelkedett expressziók elemzése révén betekintést kaphatunk a jó- és rosszindulatú daganatokban zajló összetett változásokba. A későbbiekben ezek megértése segíthet a daganatok képződésének alaposabb megismerésében és a többszintű prevenció megvalósításában.

Új eredmények összefoglalása

1. A korai klinikai stádiumú szájüregi laphámsejtes karcinoma miRNS expressziós mintázatának meghatározása:
 - a. A daganatok és ép nyálkahártya szövetek között szignifikáns miRNS kifejeződésbeli különbségeket találtunk a miR-21, -27a, -34a, -93, -143, 146a, 148a, -155, -191, -196a, -203, -205, -221 és 223. Ezek a miR-34a és -143 csökkent expressziójú miRNS-ek kivételével fokozott kifejeződést mutattak a daganatos szövetekben. A miR-21, -27a, -155, -191, -205, -221, -223 biomarker teszt hatékonyság szempontjából is alkalmazhatónak bizonyult a daganatos szövetek molekuláris elkülönítésére.
 - b. Klinikai és etiológiai tényezőkkel való összehasonlításban a miRNS expressziós profil mintázatbeli eltérései statisztikailag szignifikáns lineáris regressziót mutattunk ki a daganat szövettani grade-jével a miR34a, -143, -196a és -223, TNM státusszal a miR-155, a tumor méretével kapcsolódóan a miR-93, valamint nyirokcsomó metasztázissal miR-205 esetében.
 - c. minden statisztikai tesztet figyelembe véve a miR-155 bizonyult a szájüregi daganatok szempontjából önállóan is alkalmazható mértékben specifikus ugyanakkor szenzitív markernek is, mely nagyfokú összefüggést mutatott a daganatok klinikai előrehaladottságot jelző TNM klasszifikációjával.
2. Az NFκB jelátviteli útvonalat reprezentáló mRNS targetek kvantitatív real-time PCR expressziós analízisét végeztük el, melyen kimutattuk a szignifikáns funkcionális eltérést mutató mRNS transzkriptumokat:
 - a. A fókuszált NFκB jelátviteli rendszerhez kapcsolódó mRNS expressziós vizsgálat a *Vcam* és *Tlr1* mRNS kifejeződése mutatott szignifikánsan emelkedett expressziót a daganatos szövetekben, jelentős de statisztikailag nem szignifikáns emelkedést mutattunk ki az NFκB1 mRNS esetén is. A szájüregi daganatokban az NFκB jelátvitel tagjai a miRNS kifejeződés váltoásaival szinkron expressziós eltéréseket mutatnak. A *Vcam* mRNS fokozott expressziója szorosan kapcsolódik a karcinogenezis inváziót, lokális progressziót meghatározó lépéséhez. A miRNS-mRNS modulok együttes vizsgálata alátámasztja a miRNS dereguláció jelátviteli rendszerben értelmezhető molekuláris hatását.
3. Meso- és hypopharynx lokalizációjú laphámrákok molekuláris daganatterület-modelljét miRNS expressziós profilok segítségével határoztuk meg.
 - a. A laphámrákot körülvevő fenotípusosan ép nyálkahártya szövetek miRNS expressziós összehasonlító vizsgálata során meghatároztuk a daganatokra és peritumorális ép területekre is jellemző miRNS mintázatot a daganattól való távolság szempontjából. A daganatos szövet az ép közvetlen környezetétől a miR-21, -27a és 221 mennyiségi változásával, míg a távolabbi peritumorális szövetsávokat a miR-21, -27a, -146a, és -155 expresszió eltéréseivel különíthetők el; a távol eső normál nyálkahártya a tumorhoz viszonyított magas miR-34a és -143 kifejeződéssel azonosítható.
 - b. Lokalizáció-specifikus miRNS-eket azonosítottunk a mesopharynxban: miR-221 és hypopharynxban: miR-148a az expressziós mintázatok összevetésében. A miRNS mennyiségét tekintve a miR-21, -143 és -155 a hypopharynx daganatokban a mesopharynxénál statisztikailag szignifikánsan magasabbnak igazolódott.

4. Follikuláris pajzsmirigy adenoma, follikuláris pajzsmirigy karcinoma és papilláris pajzsmirigy karcinoma minták magas denzitású mRNS expressziós array vizsgálatát végeztük normál pajzsmirigy szövettel történő összehasonlításban.
 - a. meghatároztuk az egyes noduláris pajzsmirigydaganatcsoportnak megfelelő szignifikáns mRNS expressziós eltéréseket a normál szövethez képest. A daganatokban a malignitás mértékével párhuzamosan kimutatható volt a szignifikánsan csökkent kifejeződést mutató gének magasabb aránya. Az emelkedett expressziót mutató gének specifikusak voltak az eltérő szövettani csoportokban és egyetlen kivétellel-, amely az NF κ B volt FA és FTC esetén- nem mutattak átfedést, míg a csökkent kifejeződést mutató géneknél számos átfedést tapasztaltunk. Az átfedést mutató génekre kiemelt figyelmet fordítottunk, részletesen bemutattunk és csoportosítottuk minden szövettani csoportnál.
 - b. meghatároztuk az egyes szövettani csoportok közötti átfedést mutató expressziós eltéréseket és a közösen szabályozott jelátviteli útvonalat. Ennek kulcselemeként azonosítottuk az NF κ B gént és a hozzá kapcsolódó PPAR γ , CYLD1, EDA valamint JNK apoptózist valamint szöveti architektúrát szabályozó hálózatot.

Köszönetnyilvánítás

A dolgozatom létrejöttéhez nyújtott támogatásért köszönettel tartozom:

- Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Ember István professzor úrnak, aki megteremtette a munkámhoz szükséges tudományos, szellemi és infrastrukturális hátteret. Az együtt töltött évek során alapvetően ő inspirálta kutatói érdeklődésemet, támogatta munkámat és ösztönözte PhD hallgatói tevékenységemet.
- Dr. Kiss István professzor úrnak, jelenlegi témavezetőmnek, aki szakmai tapasztalatával segítette a dolgozatom összeállítását.
- Dr. Olasz Lajos professzor úrnak, akivel hosszú évek óta szoros és páratlan munkakapcsolatban dolgozunk a Fogászati és Szájsebészeti Klinika Maxillofaciális Sebészeti Részlegén előforduló daganatos esetek epidemiológiai és molekuláris analízisében.
- Dr. Gerlinger Imre professzor úrnak, dr. Szanyi István adjunktus úrnak, és dr. Orosz Évának, akik magas színvonalú szakmai munkájukkal a Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika részéről lehetővé tették a precíz mintagyűjtést és pontos adatrögzítést.
- Az Orvosi Népegészségtani Intézet Molekuláris Genomikai munkacsoportjában egykor és jelenleg dolgozó tagoknak, akik szakmai támogatásukon kívül barátságukkal is megajándékoztak: dr. Gőcze Katalinnak, dr. Szele Eszternek és dr. Juhász Krisztinának, akikkel a közösen végzett tudományos munka felejtetlenné vált. A munkacsoport szakasszisztenseinek, Brunnerné Bayer Zsuzsának és Herczeg Mónikának akiktől a kísérletek technikai kivitelezését tekintve a legtöbbet tanultam az elmúlt évek során, és akik odaadó támogatásukkal folyamatosan mellettem álltak. Szántódiné Molnár Ágnesnek, aki egyik legfőbb ösztönzőm, minden publikációmhoz, előadásomhoz és szakmai anyagomhoz pótolhatatlan segítséget nyújt mind a mai napig.
- A Nemzeti Kiválóság Programnak, amely az Apáczai Csere János doktorandusz ösztöndíjjal támogatta a szájüregi daganatokhoz kapcsolódó kísérleteim elvégzését.

Köszönöm családom szerető és kitartó támogatását és a mindvégig belém vetett bizalmukat.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. **K Gombos**, E Szele, I Kiss, T Varjas, L Puskás, L Kozma, F Juhász, E Kovács, I Szanyi, Ember
Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours
Cancer Genomics & Proteomics 406) pp. 403-409. (2007)
2. Gy Göbel, **K Gombos**, E Szele, E Kálmán, F Budán, I Gerlinger, F Fiscina, I Szanyi, Á Ember,
Á Németh, I Ember
Retrospective analysis of malignant salivary gland tumor sin Hungarian population between
1987-2006.
European Journal of Oncology 1404) pp. 209-215. (2009)
3. Gőcze K, **Gombos K**, Juhász K, Ember I
Környezeti karcinogének korai hatásainak mikro-RNS-alapú molekuláris epidemiológiai
biomarkerekkel történő monitorizálása (új utak a primer prevencióban).
Magyar Epidemiológia 802) pp. 83-95. (2011)
4. Gőcze Katalin, **Gombos Katalin**, Pajkos Gábor, Magda Ingrid, Ember Ágoston, Juhász Krisztina,
Paczai Balázs, Ember István
Mikro-RNS-ek jelentősége a molekuláris epidemiológiában.
Orvosi Hetilap 152016) pp. 633-641. (2011)
5. Gobel G, Szanyi I, Revesz P, Bauer M, Gerlinger I, Nemeth A, Ember I, Gocze K, **Gombos K**
Expression of NFkB1, GADD45A and JNK1 in Salivary Gland Carcinomas of Different Histotypes.
Cancer Genomics & Proteomics 1002) pp. 81-87. (2013)
6. **Gombos K**, Horvath R, Szele E, Juhász K, Gocze K, Somlai K, Pajkos G, Ember I, Olasz L
miRNA Expression Profiles of Oral Squamous Cell Carcinomas.
Anticancer Research 3304) pp. 1511-1517. (2013)
7. Orosz E, **Gombos K**, Revesz P, Kiss I, Pytel J, Gerlinger I, Szanyi I
Mikro-RNS-expressziós mintázatok mesopharynx-hypopharynx laphámcarcinomákban.
Orvosi Hetilap 155027) pp. 1063-1070. (2014)
8. Rideg O, **Gombos K**, Miseta A, Kovács L G
A humán papillómavírus nem válogat.
Ime: Informatika és Menedzsment az Egészségügyben 1308) pp. 58-62. (2014)

A dolgozat alapjául szolgáló könyvfejezet

Gombos K, Ember I

Molekuláris Közegészségtan.

In: Ember István, Kiss István, Cseh Károly (szerk.)

Dialóg Campus Tankönyvek – Natura Delectans sorozat, Budapest; Pécs: Pécsi Tudományegyetem Általános
Orvostudományi Kar, 2013. pp. 99-106.