EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az Epstein-Barr vírus prevalenciája orális laphámsejtes carcinomában és rákmegelőző állapotokban, valamint a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének genetikai és epigenetikai változásainak vizsgálata fej-nyaki tumorokban

Kis Andrea

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
1. BEVEZETÉS 5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 6
2.1. A fej-nyaki régió rosszindulatú daganatai 6
2.2. A fej-nyaki daganatok etiológiai faktorai 8
2.3. Szájüregi rákmegelőző elváltozások 10
2.3.1. Orális leukoplakia 10
2.3.2. Orális lichen planus 11
2.4. Epstein-Barr vírus 13
2.4.1. Az Epstein-Barr vírus lítikus ciklusa 14
2.4.2. Az Epstein-Barr vírus látens ciklusa 15
2.4.3. A látens EBV fertőzés során expresszálódó gének és szerepük 16
2.4.4. EBV fertőzéssel összefüggő betegségek 17
2.5. A sejtciklus és szabályozása 20
2.5.1. A p16INK4A, p14ARF tumorszuppresszor gének 21
2.6. Célkitűzések 24
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK 25
3.1. Betegcsoportok 25
3.2. Immunhisztokémia 26
3.3. DNS izolálás 26
3.4. Polimeráz láncreakció (PCR) 27
3.5. Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) 28
3.6. Szekvenálás 28
3.7. Metiláció-specifikus polimeráz láncreakció (MSP) 29
3.8. Statisztikai elemzés 29
4. EREDMÉNYEK 31
4.1. Az EBV előfordulási gyakorisága a vizsgált betegcsoportokban 31
4.2. Az EBV prevalencia adatainak statisztikai elemzése 31
4.3. Immunhisztokémia 32
4.4. Az EBV és a klinikopatológiai jellemzők összefüggésének vizsgálata 32
4.5. A tumorszuppresszor gének genetikai változásainak vizsgálata 33
4.6. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének promóter metilációjának vizsgálata 35
4.7. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének genetikai változásainak és promótereik metilációjának hatása a betegek tünetmentes túlélésére 37

5. MEGBESZÉLÉS 38
6. ÖSSZEFOGLALÁS 50
7. SUMMARY 52
8. IRODALOMJEGYZÉK 54
8.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke 54
8.2. Saját közlemények jegyzéke 63
9. TÁRGYSZAVAK 66
10.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 67
11.FÜGGELÉK 68
11.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye 68

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARF	alternative reading frame (alternatív leolvasási keret)
BL	Burkitt-lymphoma
CDK	ciklin-dependens kináz
CTL	citotoxikus T-lymphocyták
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	deoxiribonukleotid-foszfát
EBER	Epstein-Barr encoded RNA (EBV által kódolt kisméretű RNS)
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen (Epstein-Barr nukleáris antigén)
EBV	Epstein-Barr vírus
HPV	humán papillomavírus
LMP	latent membrane protein (látens membrán fehérje)
LSCC	laryngeal squamous cell cancer (laryngealis laphámsejtes carcinoma)
LOH	loss of heterozygosity (heterozigótaság elvesztése)
MSP	metiláció specifikus polimeráz láncreakció
NaOH	nátrium-hidroxid
OL	orális leukoplakia
OLP	orális lichen planus
OSCC	oral squamous cell cancer (orális laphámsejtes carcinoma)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
RB	retinoblasztóma
RNS	ribonukleinsav
SSCP	single-stranded conformation polymorphism (egyszálú konformációs polimorfizmus

1. BEVEZETÉS

A fej-nyaki daganatok csoportjába tartozó szájüregi és laryngealis daganatok komoly népegészségügyi problémát jelentenek Magyarországon. Incidenciájukat tekintve hazánk vezető helyen áll az európai országok között (Ottó, 2003; Johnson és mtsai, 2011). A szájüregi tumorok mortalitásában mindkét nem esetén az első helyen, a laryngealis daganatokat tekintve a nők körében a második, míg férfiak körében a negyedik helyen áll hazánk Európában (Ferlay és mtsai, 2010). A fejlett diagnosztikai és terápiás lehetőségek, valamint a korszerű műtéti technikák ellenére a szájüregi daganatok prognózisa is igen kedvezőtlen. A fej-nyaki daganatok legfőbb kóroki tényezőjeként a dohányzást és az alkoholfogyasztást említik, azonban egyes tanulmányok beszámoltak nem dohányzó és alkoholt nem fogyasztó betegekben kialakult orális daganatokról is. Ez arra enged következtetni, hogy a daganatok kialakulásában további tényezőknek is szerepük lehet (Andrews és mtsai, 2009; Curado és Hashibe, 2009).

A DNS tumorvírusok közül az Epstein-Barr vírus (EBV) összefüggésbe hozható különböző lymphoid- (Burkitt-lymphoma) és epithelialis eredetű (nasopharyngealis carcinoma, orális laphámsejtes carcinoma, OSCC) tumorokkal, azonban a vírus és daganatok kialakulása közötti ok-okozati összefüggés még számos tumor esetén vitatott (Thompson és Kurzrock, 2004; Michelow és mtsai, 2012). Az EBV gyakorisága és etiológiai szerepe földrajzi régiónként nagy változatosságot mutat. Jelen tanulmányunkban, orális laphámsejtes carcinomában és premalignus elváltozásokban (orális leukoplakia, OL; orális lichen planus OLP) szenvedő, kelet-magyarországi populáció mintáiban kívántuk meghatározni az EBV prevalenciáját. Az EBV lehetséges etiológiai szerepének megállapításához a betegek egészséges nyálkahártyájáról gyűjtött mintáját is megvizsgáltuk, valamint a kapott adatokat egészséges kontroll csoport eredményeivel vetettük össze.

A tumorok kialakulásában nemcsak külső tényezők, hanem a celluláris szabályozó folyamatokban bekövetkező változások is szerepet játszhatnak. A daganatképződés szempontjából kulcsfontosságúak a 9-es kromoszóma rövid karján (9p21) elhelyezkedő $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének. Ezen gének inaktivációjához vezető változásokat számos malignus kórképben vizsgálták (Macleod, 2000). Munkánk második felében célul tűztük ki, hogy a kelet-magyarországi régióból származó fej-nyaki daganatos betegekben megvizsgáljuk a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és promóter metilációs változások gyakoriságát.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A fej-nyaki régió rosszindulatú daganatai

A fej-nyaki tumorok a rosszindulatú daganatok heterogén csoportját alkotják, melyek világszerte komoly egészségügyi problémát jelentenek. Ide tartoznak az ajak, szájüreg, orrüreg, szájgarat, orrgarat, garat, gége, nyelőcső, nyálmirigyek illetve a nyak és a fül lágy szöveteinek elváltozásai (Syrjänen, 2005). Gyakoriságukat tekintve a fej-nyaki daganatok a hatodik leggyakoribb daganattípust képviselik a világon, évente mintegy 680.000 új megbetegedéssel és körülbelül 370 000 halálesettel (GLOBOCAN, 2012). A szájüregi daganatok előfordulási gyakorisága azonban a világ egyes tájain jelentős eltérést mutat. A fej-nyaki daganatok legnagyobb csoportját a szájüregi rákok képzik, melyek közé az ajak, a szájüreg és a garat (C00-C14 kódszámokkal jelölt) daganatai tartoznak. A fej-nyaki daganatokon belül, a második leggyakoribb daganat a laryngealis carcinoma, mely sokkal inkább a férfiakat érinti, a férfi-nő arány 7:1 (Parkin és mtsai, 2005). A laryngealis carcinoma főként Dél- és Kelet-Európában, Dél-Amerikában és Nyugat-Ázsiában gyakori. A 2012-es globális statisztikai adatok szerint a laryngealis daganatok incidenciája a fejlett országokban 4,9/100 000 fő a férfiak esetén, nők körében 0,6/100 000 fő, míg a kevésbé fejlett országokban 3,2 és 0,5/100 000 fő a férfiak illetve a nők esetében (GLOBOCAN, 2012). A szájüregi daganatok esetében a férfi-nő arány nem annyira kifejezett, mint a laryngealis carcinoma esetén (4:1). A dohányzási szokások változásaival egyre kiegyenlítettebbé vált a férfi-nő arány. A nők körében a dohányzás a fej-nyaki daganatok megjelenésének relatíve nagyobb kockázatával jár, mint a férfiak esetén (Freedman és mtsai, 2007). A szájüregi tumorok incidenciája mindkét nem tekintetében magas Melanéziában (22,9 és 16,0/100 000 fő a férfiak és nők esetében), Dél- és Közép-Ázsiában (pl. India) (10,1/100 000 fő a férfiaknál) illetve Közép- és Kelet-Európában, míg kevésbé gyakori Közép-Amerikában és Kelet-Ázsiában (pl. Japán) (GLOBOCAN, 2012; Jemal és mtsai, 2011). Az eltérő incidencia hátterében különböző etiológiai, szocio-ökonómiai, etnikai és kultúrális tényezők állhatnak. A tumor 5 éves túlélése átlagosan 40% körül van a szájüregi, míg 60% a laryngealis carcinoma esetén. A túlélést azonban nagymértékben befolyásolja a daganat helye, klinikai stádiuma a diagnózis idején, valamint az alkalmazott terápia (Parkin és mtsai, 2005; Nemes és mtsai, 2008).

A rosszindulatú daganatos megbetegedések száma hazánkban évek óta emelkedő tendenciát mutat. A daganatok okozta mortalitási mutatók is igen kedvezőtlenek, a második

helyet foglalják el a szív- és érrendszeri eredetű halálokok után, mintegy 25%-os gyakorisággal (Ottó, 2003). Epidemiológiai felmérések szerint Magyarország európai viszonylatban vezető helyen áll a fej-nyaki carcinomák incidenciáját és mortalitását tekintve (Ottó, 2003; Johnson és mtsai, 2011). Ferlay és munkatársai által készített felmérés szerint is Magyarország mind a száj-garatüregi mind pedig a laryngealis daganatok incidenciáját illetően az első helyen áll Európában (1. táblázat). A mortalitást tekintve mindkét nem esetén a száj-garatüregi daganatokban az első, míg a laryngealis daganatokban a nők esetében a második, a férfiak esetében a negyedik helyen áll Magyarország (Ferlay és mtsai, 2010). A hazai daganathalálozási sorrendben a száj-garatüregi (C00-C14) rosszindulatú daganatok mindkét nemre vonatkoztatva a hatodik helyet foglalják el (Nemes és mtsai, 2008). Azonban a férfiaknál súlyosabb a helyzet, ahol a fej-nyaki előfordulás a negyedik leggyakoribb daganat lokalizáció és az összes daganatos halálozás 7%-át, nőknél pedig 2%-át adja (Páldy és mtsai, 2001).

A magyarországi statisztikai adatbázisok szerint hazánkban a szájüregi carcinomák incidenciájának és mortalitásának növekedési tendenciája is aggasztó. Egyes közlemények szerint Magyarországon 1975 és 2007 között eltelt időszakban a fej-nyaki tumorok miatti halálozás közel ötszörösére emelkedett, így napjainkra már népegészségügyi problémává vált (Csejtei és mtsai, 2009). A férfi-nő arány 5,2:1 körül van. A tumor általában a 60-70 éves korosztályban jelenik meg, de egyes magyarországi és külföldi tanulmányok már beszámoltak 45 éves kor előtt kialakult szájüregi daganatokról is, melynek az alkoholfogyasztás és a dohányzás egyre korábbi életkorban való elkezdése lehet a magyarázata (Schantz és Yu, 2002; Nemes és mtsai, 2008). Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedben a diagnosztikai és terápiás lehetőségek komoly fejlődésen mentek keresztül, az orális carcinomák prognózisa általában igen kedvezőtlen. Magyarországon a szájüregi daganatok öt éves túlélési rátája kevesebb, mint 50%, melyet befolyásol a már említett lokalizáció, klinikai stádium, az alkalmazott terápia és az áttét megjelenése. Áttét megjelenése esetén a túlélés esélye nagymértékben csökken, alig 21% (Silverman, 2001; Nemes és mtsai, 2008).

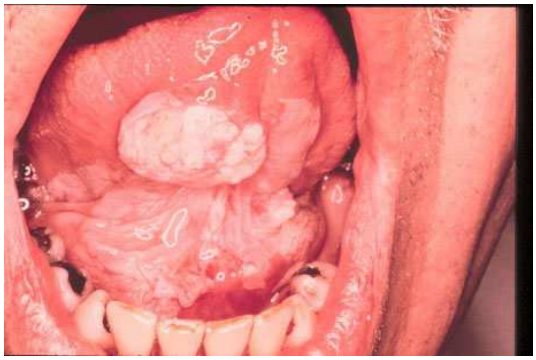
1.táblázat. Az európai országok nemek szerinti sorrendje az ajak- és szájüregi daganatok illetve a laryngealis daganatok incidenciája és mortalitása tekintetében (GLOBOCAN 2012).

Ajak- és szájüregi daganatok							
Incidencia				Mortalitás			
férfi		nő		férfi		nő	
Ország	ASR	Ország	ASR	Ország	ASR	Ország	ASR
Magyarország	**15,7**	**Magyarország**	**4,6**	**Magyarország**	**7,9**	**Magyarország**	**1,5**
Portugália	11,6	Luxemburg	3,9	Fehéroroszország	7,1	Bulgária	1,2
Szlovákia	11,4	Dánia	3,9	Ukrajna	6,4	Montenegro	1,1
Fehéroroszország	10,6	Hollandia	3,8	Litvánia	5,9	Dánia	1,1
Ukrajna	10,2	Norvégia	3,7	Szlovákia	5,9	Málta	1,0
Románia	10,0	Franciaország	3,5	Románia	5,8	Szlovákia	0,9
Laryngealis daganatok							
Incidencia				Mortalitás			
férfi		nő		férfi		nő	
Ország	ASR	Ország	ASR	Ország	ASR	Ország	ASR
Magyarország	**12,3**	Albánia	1,8	Moldova	7,3	Albánia	1,1
Moldova	11,4	**Magyarország**	**1,4**	Litvánia	6,7	Montenegro	0,7
Románia	10,4	Belgium	1,1	Bulgária	6,7	Bosznia Hercegovina	0,7
Szerbia	10,2	Bosznia Hercegovina	1,0	Fehéroroszország	6,2	**Magyarország**	**0,6**
Bulgária	10,2	Szerbia	1,0	Románia	6,2	Lengyelország	0,5
Portugália	9,7	Montenegro	1,0	**Magyarország**	**6,2**	Szerbia	0,5

ASR: age-standardised rate, világstandard szerinti korstandardizált érték 100.000 főre vonatkoztatva.

2.2. A fej-nyaki daganatok etiológiai faktorai

Hisztológiailag a fej-nyaki régiót érintő tumorok 90%-a laphámrák, melyet a nemzetközi angol szakirodalom „oral squamous cell cancer” (OSCC) illetve „laryngeal squamous cell cancer” (LSCC) névvel illet.



1. ábra. Orális laphámsejtes carcinoma (http://www.merckmanuals.com)

A szájüregi rosszindulatú daganatok etiológiája összetett. A nemzetközi szakirodalom az orális és laryngealis laphámsejtes carcinoma legfőbb kóroki tényezőjeként a dohányzást és az alkoholfogyasztást említi. Az orális carcinomák több mint 80%-a dohányzás és/vagy alkoholfogyasztás miatt alakult ki Európában és a kettő együttes hatása többszörösére növelheti a szájüregi és laryngealis daganatok kialakulásának esélyét (Döbrössy, 2005; Warnakulasuriya és mtsai, 2005; Freedman és mtsai, 2007; Curado és Hashibe, 2009; La Vecchia és mtsai, 2010). Kockázatnövelő hatásuk természetesen attól is függ, hogy az adott személy milyen mennyiségben és mennyi időn keresztül fogyasztja ezen élvezeti cikkeket. Egyes tanulmányok szerint azonban az OSCC esetek egy része (kb. 15-20%) nem dohányzó és alkoholt nem fogyasztó betegekben alakult ki (Ščėsnaitė és mtsai, 2008; Andrews és mtsai, 2009). Ez a tény arra enged következtetni, hogy a daganat kialakulásában további faktoroknak is lehet szerepe, úgymint a táplálkozási szokások (fűszeres ételek), egyéb élvezeti cikkek (bételrágás) használata, genetikai fogékonyság, rossz fogazati állapot (letört fog, fogkő irritáló hatása), krónikus fogágybetegségek előfordulása, gombás fertőzés (Candida), valamint az onkogén vírusok közül a humán papillomavírus (HPV) vagy az Epstein-Barr vírus (EBV) jelenléte (Sand és mtsai, 2002; Shimakage és mtsai, 2002; Mao és mtsai, 2004; Hansson és mtsai, 2005; Chen és mtsai, 2008; Szarka és mtsai, 2009). Ezeknek a vírusoknak az etiológiai szerepe a tumorok kialakulásában azonban még vitatott.

A daganatok kialakulásában a külső tényezőkön kívül a tumorszuppresszor útvonalakban bekövetkező változásoknak is szerepe lehet. Az onkogén vírusok géntermékei (E6, E7, EBNA-LP, EBNA-3C, LMP-1) beavatkozhatnak ezen tumorszuppresszor útvonalakba. Kölcsönhatásba léphetnek a retinoblasztóma (RB) és a p53-útvonalban szerepet játszó tumorszuppresszor és egyéb regulatorikus fehérjékkel, ami a carcinogenesis folyamatának egy lehetséges magyarázatát nyújthatja (Inman és mtsai, 1995; Ohtani és mtsai, 2003; Knight és mtsai, 2005; Saha és mtsai 2009; Jiang és Yue, 2014).

2.3. Szájüregi rákmegelőző elváltozások

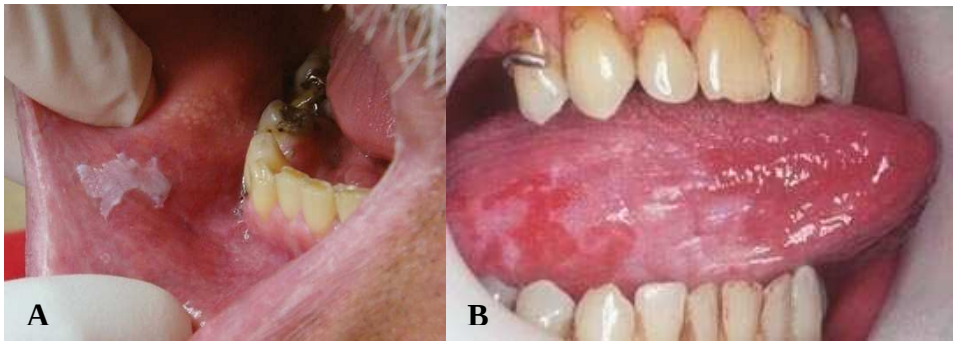
A premalignus lézió a definíció szerint olyan patológiásan megváltozott állapotú szövet, melyből a különböző daganatkeltő tényezők hatására nagyobb valószínűséggel alakul ki rosszindulatú elváltozás, mint az ép, egészséges szövetekből (Barnes és mtsai, 2005). Megjelenésük megelőzheti a szájüregi malignus daganatok kialakulását. Fontos megemlíteni, hogy nem minden precancerosus elváltozásból indul ki malignus folyamat és nem minden rosszindulatú daganat alakul ki rákmegelőző állapot talaján. Ezek alapján megkülönböztetünk obligát premalignus elváltozásokat, melyekből egy idő után biztosan daganat alakul ki, illetve fakultatív precancerosisokat, ahol a malignus elfajulás nem mindig jelentkezik (Braun-Falco és mtsai, 2000). Permalignus léziónak tekinthető például a leukoplakia. Emellett precancerosus állapotok is ismertek; ezekben az esetekben az egész szervezet állapota változik meg úgy (vashiányos anaemia, diabetes mellitus, hepatitis C vírusfertőzés, csontvelő transzplantáció, stressz), hogy nagyobb a daganatok kialakulásának kockázata. Jelenleg az orális lichen planust az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) precancerosus állapotként tartja számon, azonban egyöntetű álláspont még nem született ennek kapcsán.

2.3.1. Orális leukoplakia

Az orális leukoplakia (OL) a leggyakrabban előforduló premalignus elváltozás. A WHO megfogalmazása szerint olyan, 0,5 cm-nél nagyobb, krónikusan fennálló fehér folt, mely nem törölhető le a nyálkahártyáról és klinikai vagy szövettani szempontból más betegségcsoportba nem sorolható (Silverman és mtsai, 1984). A betegség bármely életkorban előfordulhat, de leginkább a 40-50 éves korosztályt, elsősorban a férfiakat érinti (férfi-nő arány 3:1). Előfordulási gyakorisága az egyes országokban 0,1 és 11,7% között változik, Magyarországon 0,57-3,6% közötti (Bánóczy és mtsai, 2001).

Klinikailag az OL homogén és nem homogén formáját különböztethetjük meg. A homogén leukoplakia legtöbbször a buccán vagy az alveolaris gerincen kialakuló, fehér, egyenletes felszínű, fájdalmatlan plakk, mely vörös komponenseket nem tartalmaz. A nem homogén csoportba tartozik a verrucosus, a nodularis típus és az erythroleukoplakia (Batsakis, 2003). A verrucosus változat fehér, a felszínből kissé kiemelkedő elváltozás, melyet vörös atrófiás területek vehetnek körül. A nodularis típus félgömbszerűen emelkedik ki a felszínből. Az erythroleukoplakia fájdalmas vörös és fehér foltokként jelenik meg, mely elszarusodásra, kifekélyesedésre hajlamos. A malignus transzformáció esélye függ a lézió helyétől, szövettanától, a hámdysplasia jelenlététől vagy hiányától. Legkevésbé a homogén, míg leggyakrabban a nem homogén csoportba tartozó erythroleukoplakia hajlamos a

malignizálódásra. Globálisan körülbelül 1%-ra tehető a leukoplakiák átlagos transzformációs rátája. Egyes tanulmányok szerint az OL elváltozások malignus elfajulásának esélye 4-6% körül van, ez azonban populációként és típusonként eltérő lehet. Az erythroleukoplakia malignus transzformációjának esélye például 14,3-50% között van (Bánóczy, 1977; Napier és Speigh, 2008).



2. ábra. Homogén leukoplakia (A) a szájüreg nyálkahártyáján és erythroleukoplakia (B) a nyelven (http://www.dentalaegis.com; http://www.nature.com)

Az OL kialakításában számos lokális kémiai és mechanikai tényező vehet részt, úgymint a dohányzás, alkoholfogyasztás, fűszeres ételek fogyasztása, rossz fogazati állapot vagy a rosszul felhelyezett fogművek irritáló hatása. Több irritatív tényező együttes jelenléte növelheti a léziók kialakulásának esélyét (Chen és mtsai, 2006; Petti és Scully, 2006). Az OL egyes változataihoz Candida fertőzés is társulhat, mely segítheti a lézió malignus transzformációját (Dany és mtsai, 2011). Ezen rizikófaktorokon kívül különböző virális faktorok szerepe is felmerült a betegség patogenezisében, úgymint a humán papillomavírus (HPV) vagy az Epstein-Barr vírus (EBV) (Bagan és mtsai, 2008; Szarka és mtsai, 2009), bár az EBV szerepét a HIV (humán immundeficiencia vírus) pozitív betegek orális hajas leukoplakiájának kontextusában vizsgálták a legtöbbet (Slots és mtsai, 2006; González és mtsai, 2010). A leukoplakia egyéb formáinak EBV pozitivitásáról jelen tudásunk szerint nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

2.3.2. Orális lichen planus

Az orális lichen planus (OLP) a kután lichen planus szájnyálkahártyán megjelenő formája, nem fertőző, krónikus lefolyású gyulladásos betegség, mely főként a 30-60 éves korosztályban fordul elő, elsősorban a nők körében. Előfordulási gyakorisága 0,3-2,6 %-ra tehető a különböző populációkban (Ismail és mtsai, 2007). A betegség diagnosztizálása nehéz feladat, mivel nincsenek egységes diagnosztikai kritériumok. Diagnosztizálása a klinikai kép

és szövettani vizsgálat alapján történik. A klinikai kép vizsgálatában nehézséget jelent, hogy az OLP-tól el kell különíteni az orális lichenoid léziókat, melyek nagyon hasonló megjelenésűek. A szövettani diagnózis egységessé tételét az nehezíti meg, hogy az elváltozásokat felépítő szövettani elemek az egyes léziókban eltérő megjelenést mutathatnak.

3. ábra. Orális lichen planus (http://www.cixip.com)

Klinikai megjelenési formái igen változatosak, melyek főként a szájnyálkahártyán, a nyelven és a fogínyen jelennek meg. Megkülönböztetünk retikuláris, papularis, plakk-szerű, erozív, atrófiás és bullosus típust. Leggyakrabban a retikuláris forma figyelhető meg, mely gyakran fájdalmatlan, legtöbbször a szájnyálkahártyán megjelenő fehér, hálószerű rajzolatú, le nem törölhető elváltozás. Ritkábban fordul elő a papularis és a plakk forma, melyek közül az előbbit apró fehér papulák alkotják; az utóbbi főként dohányosokban gyakori, a nyelvháton és a buccán megjelenő összefolyó fehér foltok jellemzik. Az erozív, atrófiás és bullosus típusok az úgynevezett vörös elváltozásokhoz tartoznak, melyeket gyakran kísér égő érzés vagy fájdalom és az esetek többségében retikuláris elemekkel együtt fordulnak elő. Az OLP etiológiája ma sem ismert pontosan, azonban az utóbbi években kóroki tényezőként az autoimmun hatás és a pszichés faktorok szerepe is előtérbe került. Egyes szerzők szerint az OLP egy T-sejt mediált autoimmun betegség, melyben a CD8+ citotoxikus T-sejtek az orális epithelium bazális sejtjeinek apoptózisát váltják ki (Ismail és mtsai, 2007).

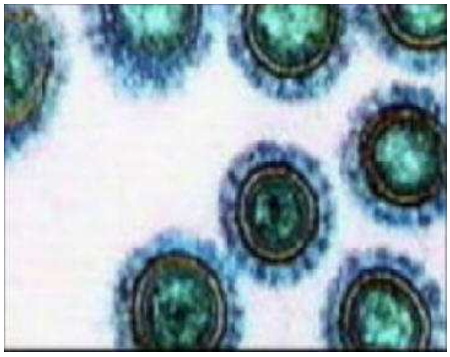
A retikuláris, papularis és plakk léziók esetében a malignus elfajulás kockázata csekély, míg a vörös elváltozások esetében a malignizáció kockázata nagyobb. Az OLP malignus elfajulásának kockázata az egyes tanulmányok szerint 0-5,3%-ra tehető, mely függ a klinikai megjelenés típusától és a követési időtől (Ismail és mtsai, 2007; Mithani és mtsai, 2007; Gonzalez-Moles és mtsai, 2008). Ahhoz azonban, hogy az OLP talaján malignus elváltozás alakuljon ki, több tényező együttes jelenléte szükséges. Ilyen malignus transzformációra hajlamosító faktorok lehetnek például a cukorbetegség, a hepatitis C vírus (HCV), a gombás (Candida) fertőzések, a dohányzás, alkoholfogyasztás, rossz szájhigiéne és

fogazati állapot. Ezen kívül felmerült egyes vírusok, mint például a HPV és az EBV szerepe is a betegség kialakulásában és malignus transzformációjában (Sand és mtsai, 2002; Gonzalez-Moles és mtsai, 2008; Szarka és mtsai, 2009). A víruseredetet azonban még nem bizonyították egyértelműen.

2.4. Epstein-Barr vírus

1958-ban Denis Burkitt, brit sebész írta le először a később róla elnevezett, Afrika egyenlítői részén endemikusan előforduló Burkitt-lymphomát (BL) (Burkitt, 1958). A megbetegedés gyermekeket érintő, elsősorban a fej-nyaki területen jelentkező, nyiroksejtekből kiinduló rosszindulatú daganat. 1964-ben Epstein és munkatársai BL-ból kialakított sejtvonalak elektronmikroszkópos vizsgálata során herpeszvírus-szerű részecskéket fedeztek fel, melyek különböztek a már ismert humán herpesvírusoktól. Később az Epstein-Barr vírus lett az első humán tumorvírus, melyet a BL okozójaként azonosítottak (Epstein és mtsai, 1964).

Az Epstein-Barr vírus (EBV; humán herpesvírus 4) a *Herpesviridae* családba, a Gammaherpesvirinae alcsalád Lymphocryptovirus nemzetségébe tartozik. Genomja 175 kilobázis nagyságú, lineáris, dupla szálú DNS, mely közel 100 gént kódol (Kieff és Rickinson, 2001). A vírus genomját ikozahedrális szimmetriájú kapszid veszi körül. A kapszidon kívül található a lipoproteineket és glikoproteineket tartalmazó vírusburok, mely a gazdasejt külső magmembránjából származik. A kapszid és a burok közötti réteg a tegumentum. A burokkal rendelkező, érett virionok átmérője 120-180 nm (Odumade és mtsai, 2011). A vírusnak két típusa különíthető el, az EBV-1 és EBV-2. A legtöbb populációban az 1-es típus fordul elő gyakrabban, főként a nyugati féltekén és Délkelet Ázsiában, míg mindkét típus egyenlő arányban fordul elő az egyenlítői Afrika területén és Pápua Új-Guineában. A két típus közötti legszámottevőbb különbség a nukleáris antigének szekvenciájában (EBNA-2, -3A, -3B, -3C) található (Slots és mtsai, 2006; Odumade és mtsai, 2011). Az EBV igen elterjedt, ubiquiter vírus, a populáció közel 90%-a fertőződik az élete során (Thompson és Kurzrock, 2004). Szeroepidemiológiai vizsgálatok szerint a primer fertőzés a fejlődő országokban már kisgyermekkorban bekövetkezik, mely a rosszabb életkörülményekkel és higiéniával magyarázható. Ugandában például a gyermekek több mint 80%-a fertőződik a vírussal egy éves korára. Ezzel szemben a fejlett országokban a primer fertőzés a későbbi életkorra tevődik. Az USA-ban az 5 éves gyermekeknek csak 45-50%-a mutat szeropozitivitást (Hsu és Glaser, 2000; Slots és mtsai, 2006).



4. ábra. Epstein-Barr vírus (http://www.coloradocancerblogs.org)

A vírus terjedése elsősorban orális kontaktussal, nyállal vagy szexuális úton történhet. A fertőzés leggyakoribb behatolási kapuja az orr-garat nyálkahártyája. *In vivo* elsősorban a B-lymphocytákat, valamint az oropharynx, parotis és méhnyak epithelialis sejtjeit képes megfertőzni. Az epithelialis sejtek fertőződését követően a B-sejtek fertőzése a környező lymphoid szervekben/szövetekben történik meg. A vírus-gazdasejt kapcsolódása komplex folyamat, mely során a vírus gp 350/220 glikoproteinje kapcsolódik a sejtek felületén lévő CD21 virális receptorral. A többi herpeszvírushoz hasonlóan az EBV esetében is megkülönböztetünk lítikus és látens életciklust. A lítikus ciklust aktív vírusprodukció jellemzi, mely a gazdasejt lízisét okozza. A primer fertőzést követően a vírus látens ciklust alakít ki a nyugvó B-lymphocyták egy kisebb hányadában (1-50 sejt/10^6 B-lymphocyta), mely során a vírus nem szaporodik (Cohen, 2000; Mandell és mtsai, 2010). A fertőzött B-sejtekben a vírus genomja episzómális (cirkuláris) vagy kromoszómába integrálódott alakban van jelen. Mivel a látensen fertőzött B-sejteben csak néhány virális fehérje termelődik, valamint a vírus rendelkezik olyan fehérjékkel, melyek nagyfokú szekvenciális és funkcionális homológiát mutatnak egyes celluláris molekulákkal (pl.: IL-10), ezek a fertőzött sejtek „láthatatlanok” maradnak az immunrendszer számára és a vírus képes élethosszig tartó perzisztencia kialakítására (Cohen és mtsai, 2000; Thompson és Kurzrock, 2004). Ebből a látens állapotból a vírus reaktiválódhat és visszatérhet a lítikus szaporodási ciklusba, hogy újabb sejteket fertőzzön meg. Azonban ezek a későbbi reaktivációk egészséges egyénekben nem produkálnak tüneteket.

2.4.1. Az Epstein-Barr vírus lítikus ciklusa

A primer vírusfertőzést követő korai, sejten belüli történésekről kevés információ áll rendelkezésünkre, mivel a tünetek megjelenését egy 4-6 hétig tartó inkubációs szakasz előzi meg. A lítikus ciklus során aktív vírusreplikáció történik a virális DNS polimeráz segítségével, mely a gazdasejt lízisét okozza. Elsőként a nagyon korai (immediate early, IE)

gének expresszálódnak, melyek közül a legfontosabb a BamHI Z és R leftward reading frame (BZLF1, BRLF1) gének. Ezek a gének transzkripciós aktivátorokat kódolnak, melyek szerepet játszanak a korai virális gének expressziójának szabályozásában és a gazdasejt egyes promótereinek aktiválásában. Továbbá a BZLF1 a látens-lítikus ciklus átmentének kulcs proteinje. Ezt követően a korai (early, E) gének íródnak át, melyek replikációs proteineket kódolnak (pl.: virális DNS polimeráz) és szabályozzák a virális DNS replikációját. Végül, a vírusreplikáció utolsó szakaszában a késői (late, L) gének is átíródnak, melyek a virion felépítéséhez szükséges struktúrális antigéneket (pl.: virus capsid antigen, VCA) kódolják (Kieff és Rickinson, 2001; Tsurumi és mtsai, 2005; Odumade és mtsai, 2011).

2.4.2. Az Epstein-Barr vírus látens ciklusa

A látens ciklusban nincs aktív vírusszaporodás, a vírus csak a gazdasejt osztódásakor kettőződik meg, melyhez a gazdasejt replikációs apparátusát használja. Ellentétben a lítikus ciklussal, a látens fertőzés során a csaknem 100 virális génből csak hat EBV nukleáris antigén (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C. –LP), három látens membrán protein (LMP-1, -2A, -2B), az EBV-kódolt kis RNS-ek (EBER1, EBER2), valamint a BamHI A régió transzkriptumai (BART) expresszálódnak. Az eltérő promóter használat és az ennek hátterében álló különböző virális génexpressziós mintázat alapján három látencia típus különíthető el, melyek jellemzőek az egyes EBV-asszociált kórfolyamatokra.

Az I. típusú látencia az endémiás Burkitt-lymphomára jellemző, csak az EBNA-1 és az EBER-ek jelennek meg. A II. típusban az EBNA-1, LMP-1, LMP-2, valamint az EBER-1 és -2 expresszálódik. A II. típusú látenciát nasopharyngealis carcinomában, Hodgkin-kórban és perifériás T-sejtes lymphomában figyelték meg. A III. típusú látenciában az összes EBV nukleáris antigén (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C. –LP), a látens membránproteinek (LMP-1 és -2) és az EBER-ek is expresszálódnak. Ez a típus, jellemző például a lymphoproliferatív megbetegedésekre és a fertőző mononucleosisra (mononucleosis infectiosa, MI) (Cohen és mtsai, 2000; Odumade és mtsai, 2011) (2. táblázat). Ezek a virális géntermékek képesek a B-lymphocyták sejtciklusba történő beléptetésére, a fertőzött sejtek folyamatos proliferációjának fenntartására és transzformálására (Kieff és Rickinson, 2001). Fontos azonban megjegyezni, hogy a I. és II. típusú látenciában csak kevés virális antigén expresszálódik, így a fertőzött sejtek elkerülik a citotoxikus T-lymphocyták (CTL) hatását. Ellenben a III. típusú látens állapotban expresszálódó EBNA-3 a CD8+ T-lymphocyták fő célpontja, így ebben az állapotban lévő sejtek általában gyorsan eliminálódnak a CTL-nak köszönhetően. A III. típusú

látencia ezért csak immunszupprimált állapotban (transzplantált betegek, AIDS-es betegek) tartható fent (Kimura és mtsai, 2013).

2. táblázat. Az EBV látenciatípusaival összefüggő malignus elváltozások

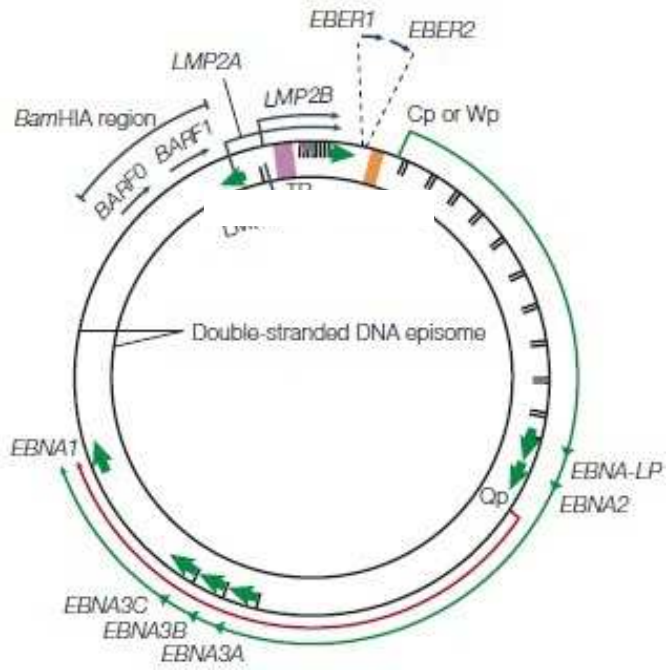
Látencia típus	Expresszált virális gének	Malignus elváltozások
I.	EBNA-1, EBER-ek	Burkitt-lymphoma gyomor carcinoma
II.	EBNA-1, LMP-1 és -2, EBER-ek	nasopharyngealis carcinoma, Hodgkin-kór, perifériás T-sejtes lymphoma
III.	EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C. –LP, LMP-1 és -2, EBER-ek	lymphoproliferatív megbetegedések fertőző mononucleosis

2.4.3. A látens EBV fertőzés során expresszálódó gének és szerepük

Az **EBNA-1** egy szekvencia-specifikus DNS kötő foszfoprotein. Szerepe van a virális genom episzómális alakban való fenntartásában. Részt vesz a vírus replikációjának és transzkripciójának szabályzásában, valamint a látens állapot megtartásában (Kieff és Rickinson, 2001; Thompson és Kurzrock, 2004).

Az **EBNA-2** fontos szerepet játszik a sejtek immortalizálásában**,** valamint számos virális és celluláris gén transzaktiválásában vesz részt. Az EBNA-2 és az EBNA-LP az első látens protein, amely az EBV fertőzést követően expresszálódik. Az EBNA-LP-vel együtt indukálja a sejtek G0-G1 fázisba való átmenetét (Bornkamm és mtsai, 2001; Thompson és Kurzrock, 2004).

Az **EBNA-LP** együtt expresszálódik az EBNA-2-vel, fokozza annak transzaktiváló hatását. A retinoblasztóma proteinhez (pRb) és a p53 tumorszuppresszor fehérjéhez való kötődésével befolyásolja a sejtciklust és szerepet játszhat a B-sejtek immortalizálásában (Székely és mtsai, 1993; Thompson és Kurzrock, 2004).



5. ábra. Az Epstein-Barr vírus genomja (https://microbewiki.kenyon.edu)

Az **EBNA-3A, -3B és -3C** transzkripciós regulátorok. Az EBNA-3A és -3C a B-sejtek immortalizálásában vesznek részt. Az EBNA-3B a CTL közvetítette immunválasz fő célpontja (Bornkamm és mtsai, 2001; Thompson és Kurzrock, 2004).

Az **LMP-1** és **LMP-2** membránba ágyazott fehérjék, különböző szignál útvonalakon hatva gátolják a B-sejtek apoptózisát. Az LMP-2-nek ezen kívül szerepe lehet az oncogenesis folyamatában Hodgkin-kórban és nasopharyngealis carcinomában (Bornkamm és mtsai, 2001; Thompson és Kurzrock 2004).

Az **EBER**-ek az EBV legnagyobb mennyiségben expresszált termékei, mindegyik látencia típusban megjelennek. Az oncogenesisben és a Burkitt-lymphoma sejtek malignus fenotípusának megtartásában lehet szerepük, pontos funkciójuk azonban nem tisztázott (Thompson és Kurzrock 2004).

2.4.4. EBV fertőzéssel összefüggő betegségek

A gyermekkorban történő primer EBV fertőzés általában tünetmentes vagy nem különböztethető meg más enyhe, rövid lefolyású betegségektől. Ha azonban a primer fertőzés serdülő vagy fiatal felnőtt korban történik, nagyobb eséllyel alakulhat ki mononucleosis infectiosa (MI). A MI akut lefolyású betegség, legjellemzőbb tünetei a láz, torokfájás és a megnagyobbodott nyirokcsomók. A kialakult kórkép pár hét alatt spontán gyógyul (Ebell, 2004). A primer fertőzést követően a vírus látens állapotba kerül a B-lymphocytákban. A

krónikus aktív EBV fertőzés (chronic active EBV, CAEBV) egy ritka, elhúzódó betegség, melyet sokszor el kell különíteni a krónikus fáradtságtól. A CAEBV fertőzést primer EBV fertőzés előzi meg, különböző szervi betegségekkel (pneumonia, hepatitis, hematológiai elváltozások) jár együtt, mely 6 hónapnál tovább fennállnak és a vírus-specifikus ellenanyagok szintje emelkedett a vérben (Cohen és mtsai, 2000).

Az EBV onkogén potenciáljának köszönhetően képes fertőzni és transzformálni a nyugvó B-lymphocytákat és folyamatosan proliferálódó lymphoblastoid sejteket (LCL) hoz létre. A virális génekről átíródó fehérjék közül az LMP-1, LMP-2 és az EBNA-nak szerepe van a transzformációs aktivitásban illetve a carcinogenesis folyamatában. Néhány fehérjét ezek közül EBV-asszociált malignus sejtekben immunhisztokémiai analízissel sikerült kimutatni (Bornkamm és mtsai, 2001). Az EBV fertőzés összefüggésbe hozható különböző lymphoid tumorok kialakulásával, így például a Burkitt-lymphomával, Hodgkin-kórral és az immunszupprimáltak lymphoproliferatív megbetegedéseivel (X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív szindróma, transzplantáltak és AIDS betegek lymphoproliferatív kórképei).

A Burkitt-lymphoma (BL) főként gyermekeket érintő, B-sejtekből kiinduló agresszív daganat. Három típusát különböztetjük meg: endemikus, sporadikus és AIDS-hez társuló BL. Az endemikus forma az egyenlítői Afrika területén és Pápua Új-Guineában gyakori (Hsu és Glaser, 2000). A tumor főként az állkapocs és az arc csontjait érinti. Előfordulása szoros összefüggést mutat a malária, mint kofaktor előfordulásával. Az EBV az esetek csaknem 100%-ban kimutatható (Michelow és mtsai, 2012; Kimura és mtsai, 2013). A sporadikus BL gyermekeket és fiatal felnőtteket érint, Európában és az Egyesült Államokban jelenik meg. Ellentétben az endemikus BL-val a betegség a hasi régiót érinti és az EBV megjelenése is alacsonyabb, mintegy 20% (Crawford, 2001; Michelow és mtsai, 2012; Kimura és mtsai, 2013). Az AIDS-hez asszociált forma gyakoribb az előbb említett BL típusoknál és az esetek 30-40%-ban jelenik meg EBV fertőzés (Hsu és Glaser, 2000; Michelow és mtsai, 2012).

A Hodgkin-lymphomát (Hodgkin disease, HD) a jellegzetes Reed-Sternberg daganatsejtjei alapján lehet elkülöníteni a többi lymphomától (Thompson és Kurzrock, 2004). Leggyakrabban a 15-34 év közötti és a 60 év feletti korosztályt érinti, de HIV fertőzöttekben és transzplantáltakban is kialakulhat. A HD előfordulása az egyes országokban szűk határok között mozog, ez alól kivétel Ázsia, ahol ritka a lymphomás megbetegedés. Szövettani megjelenése alapján több altípusa van, melyek eltérő EBV pozitivitást mutatnak. Azonban a vírus megjelenése nemcsak a típustól, hanem a földrajzi régiótól, szociális körülményektől és a kortól is függ. A kevésbé fejlett országokban az esetek 90-100%-ban jelenhet meg a vírus,

míg Európában és az Egyesült Államokban ez az arány jóval kisebb, 40-50% (Hsu és Glaser, 2000; Crawford, 2001).

Az immunoszupprimáltak lymphoproliferatív betegségei főként a szerv- vagy csontvelő transzplantáltakat és az AIDS betegeket érintik. A betegség hajlamosító tényezői közé sorolható a nagy dózisú immunoszuppresszív terápia és a primer EBV fertőzés. A kezeletlen esetek halálos kimenetelűek és még a kezelés ellenére is magas lehet a mortalitás aránya. Az immunoszupprimáltak lymphoproliferatív betegségeinek incidenciája a transzplantált betegek körében 0,5-30% közé esik és többségük (90%) összefüggésben van az EBV fertőzéssel (Crawford, 2001; Thompson és Kurzrock, 2004; Mandell és mtsai, 2010; Michelow és mtsai, 2012).

Az EBV a lymphoid eredetű tumorokon kívül az epithelialis eredetű rákos elfajulások kialakulásáért is felelős lehet. A nasopharyngealis carcinoma (NC) Dél-Kelet Ázsia egyes részein gyakori, főként a középkorú férfiakat érintő daganatos megbetegedés. Ezen az előfordulási területen túlnyomórészt a daganat nem keratinizált formája fordul elő, mely esetében a betegek csaknem 100%-a mutat pozitív EBV szerológiát. (Kieff és Rickinson, 2001; Michelow és mtsai, 2012). Az EBV fertőzésnek szerepet tulajdonítanak még egyéb epithelialis tumorokban, mint például gyomor carcinomában, nyálmirigyrákban vagy emlő carcinomában (Hsu és Glaser, 2000; Hippocrate és mtsai, 2011). Mindezek mellett szerepe lehet a fej-nyaki tumorokhoz tartozó orális laphámsejtes carcinoma (OSCC) valamint egyes benignus és ponteciálisan malignus orális léziók és betegségek (orális lichen planus, gingivitis; periodontitis) kialakításában (Thompson és Kurzrock, 2004; Hernádi és mtsai, 2010; Michelow és mtsai, 2012).

A különböző tanulmányokat tekintve az EBV jelenléte a szájüregi mintákban nagyon változatos. A legtöbb dél-kelet ázsiai tanulmány magas EBV prevalenciát mutatott ki OSCC-ben, ezáltal etiológiai szerepet tulajdonítanak a vírusnak a betegség kialakulásában. Ezt egy egyiptomi populációban elvégzett vizsgálat is alátámasztja, ahol a vírus LMP-1 fehérjéjét mutatták ki immunhisztokémiával (Higa és mtsai, 2002; Higa és mtsai, 2003; Shaama és mtsai, 2008.). Ezzel ellentétben az észak-amerikai, valamint északnyugat-, és délkelet-európai tanulmányok egyöntetűen alacsony EBV prevalencia adatokról számolnak be OSCC-s betegekben, mely alapján az EBV etiológiai szerepe OSCC-ben kétségessé válik (Atula és mtsai, 2997; Mao és mtsai, 1993; Cruz és mtsai 2000; Goldenberg és mtsai, 2004; Nola-Fuchs és mtsai, 2012).

2.5. A sejtciklus és szabályozása

A sejtek életciklusa négy szakaszra osztható: G1, S, G2 és M szakasz. A sejtciklus különböző fázisait bonyolult szabályzó rendszerek és ellenőrző pontok irányítják (Nurse, 1994).

A sejtciklus szabályozásában részt vesznek többek között különböző proto-onkogének, ciklin-dependens kinázok (CDK), transzkripciós faktorok, DNS „repair" gének, valamint tumorszuppresszor gének. A proto-onkogének a sejtciklus G1-S fázis átmenete során fejtik ki hatásukat. Olyan jelátviteli folyamatokban vesznek részt, melyek elősegítik a sejtnek a sejtcikluson való áthaladását. A CDK-ok a sejtciklus G1-S és G2-M fázis átmentét szabályozzák és csak akkor aktívak, ha szabályzó fehérje alegységek (ciklinek) kapcsolódnak hozzájuk (Sherr és Roberts, 2004).

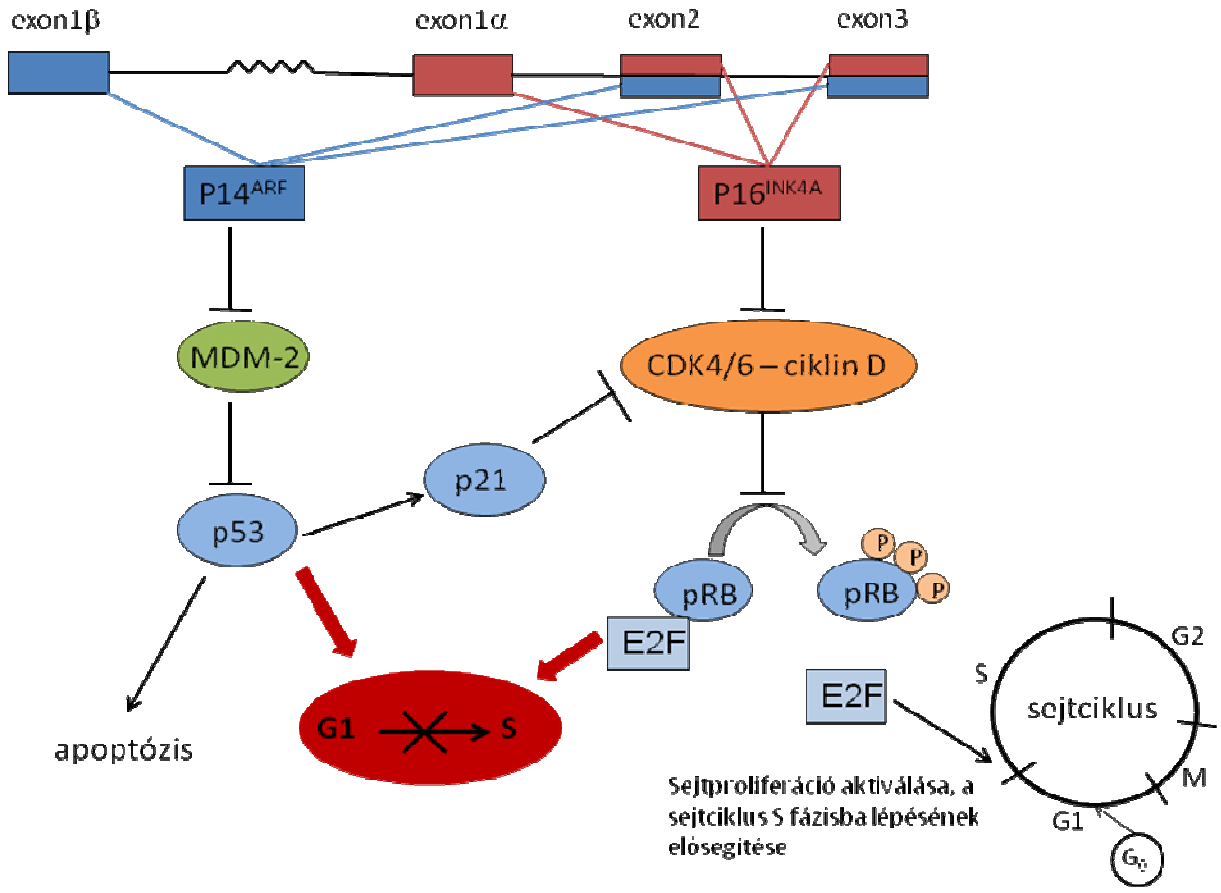
A tumorszuppresszor gének a proto-onkogénekkel ellentétben a sejtosztódás antagonistái. A sejtciklust ellenőrzik és amennyiben a génállományban károsodás jön létre, leállítják a sejtosztódást vagy apoptózist indukálnak. Gátolhatják a G1-S vagy G2-M fázis átmentet. Funkciójuk elvesztése - melyhez mindkét allél inaktivációja szükséges – a sejtciklus szabályozásának felbomlásához, folyamatos, kontrollálatlan sejtosztódáshoz és malignus transzformációhoz vezethet. A malignus daganat kialakulása azonban többlépcsős folyamat, melyben a tumorszuppresszor gének változásain kívül még számos, a sejtciklust szabályzó gének és géntermékek genetikai változásainak (mutációinak) együttes hatása érvényesül. A malignus folyamatok kialakulása során az egyik leggyakrabban érintett a retinoblasztóma (RB/p16INK4a/ciklin D) és a p53 (p53/p14ARF/MDM2) tumorszuppresszor útvonal (Macleod, 2000). A retinoblasztóma (RB) génről átíródó fehérje (pRb) a sejtciklus negatív szabályozásában vesz részt. A sejtciklus G1 fázisában hipofoszforilált állapotban köti az E2F transzkripciós fehérjét, ezáltal gátolja a sejtproliferációt és a sejtciklus G1-S fázis átmenetét. A ciklin D-CDK4/6 komplex aktivációja foszforilálja a pRb fehérjét, így gátló hatása megszűnik, az E2F szabaddá válik és a sejt a G1 fázisból az S fázisba léphet (Giacinti és Giordano, 2006). A pRb fehérjét a DNS tumorvírusok közül az EBV korai fehérjéi (EBNA-3C, EBNA-LP) is inaktiválhatják. A p53 fehérje a genom stabilitását biztosítja; ez volt az első tumorszuppresszor gén, melyet az apoptózissal kapcsolatba hoztak. Aktivációját kiválthatja DNS károsodás, hipoxia vagy onkogén szignálok. Ekkor leállítják a sejtciklust a G1 vagy G2 fázisban a DNS repair rendszer számára vagy apoptózist indukálnak. Funkcióját befolyásolhatják az EBV virális onkoproteinjei (EBNA-LP) és számos celluláris fehérje, mint például az MDM-2, mely a sejtmagban képes kötődni a p53-hoz és előidézni a citoplazmában történő degradációját (Ryan és mtsai, 2001).

2.5.1. A p16INK4A, p14ARF tumorszuppresszor gének

A humán 9-es kromoszóma rövid karján (9p21) 1993-ban egy új gént fedeztek fel, melyről egy 16 kDa molekulatömegű fehérje íródik át. Élesztő két-hibrid rendszer vizsgálatával nyilvánvalóvá vált, hogy ez a fehérje a CDK4 inhibítoraként működik. Ezért a gént INK4A-nak, a fehérjét $p16^{INK4A}$-nak nevezték el. Mivel későbbi, független tanulmányok is leírták ezt a gént, különböző nevekkel illették. A későbbi tanulmányok többféle daganatban is leírták a 9p21 genetikai változását, így MTS1-nek, azaz „multiple-tissue tumoursuppressor gene”-nek nevezték. A humán genom projektben a lókusz elnevezés alapján CDKN2-nek illetve a CDK4 inhibitor funkciója alapján, CDK4I-nek is nevezték. (Ruas és Peters, 1998).

A $p16^{INK4A}$ fehérjét az INK4A/ARF lókuszon elhelyezkedő exon 1α, exon 2 és exon 3 kódolják. Korábban úgy tudták, hogy ezen a lókuszon csak ez a három exon található. 1995-ben azonban felfedeztek egy másik exont (exon 1β), mely kb. 20 kilobázis távolságra megelőzi az exon 1α-t. További vizsgálatok kiderítették, hogy az INK4A lókuszról két fehérje íródik át: a már említett $p16^{INK4A}$ és az exon 1β, exon 2 és exon 3 által kódolt $p14^{ARF}$. A két fehérje különböző promótert használ, a közös második exon pedig eltérő leolvasási kerettel íródik át. Ezért nevezik a génterméket $p14^{ARF}$-nek („alternative reading frame”), a lókuszt pedig INK4A/ARF-nek.

Mindkét tumorszuppresszor fehérje a sejtciklus G1-S fázis átmenetét gátolja, eltérő útvonalon. A $p16^{INK4A}$ képes kapcsolódni a CDK4/6-hoz, melyek így inaktív állapotban maradnak és nem képesek kötődni a ciklin D-hez. A ciklin D-CDK4/6 komplex hiányában a pRb foszforilálatlan marad és továbbra is köti az E2F transzkripciós faktort. Így a $p16^{INK4A}$ fehérje közvetett úton képes gátolni a sejtciklus G1-S fázis átmenetét és az E2F-függő transzkripciót. A $p14^{ARF}$ fehérje a p53 útvonalon keresztül gátolja a sejtciklust. Amino terminális részével képes kötődni az MDM2 fehérjéhez, ezáltal megakadályozza a p53 fehérje MDM2 függő transzportját és lebomlását a citoplazmában. A $p14^{ARF}$ stabilizálja a p53-at a sejtmagban, amely az apoptózis és a hibajavító mechanizmusok indukciója szempontjából nélkülözhetetlen (Sherr és Weber, 2000).



6. ábra. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének kódoló szakaszai és a fehérjék szabályozó szerepe. (→ :aktiváló hatás, ⊥ : gátló hatás). A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor fehérje a sejtciklus G1-S fázis átmenetét gátolja, eltérő útvonalon. A $p16^{INK4A}$ kapcsolódik a CDK4/6-hoz, melyek így inaktív állapotban maradnak és nem képesek kötődni a ciklin D-hez. A ciklin D-CDK4/6 komplex hiányában a pRb foszforilálatlan marad és köti az E2F transzkripciós faktort, mely a sejtproliferáció aktiválásában és az S fázisba való lépés elősegítésében játszik szerepet. Így a $p16^{INK4A}$ fehérje közvetett úton gátolja a sejtciklus G1-S fázis átmenetét. A $p14^{ARF}$ fehérje a p53 útvonalon keresztül gátolja a sejtciklust. Amino terminális részével képes kötődni az MDM2 fehérjéhez, ezáltal megakadályozza a p53 fehérje MDM2 függő transzportját és lebomlását a citoplazmában. A $p14^{ARF}$ stabilizálja a p53-at a sejtmagban, amely az apoptózis és a hibajavító mechanizmusok indukciója szempontjából nélkülözhetetlen.

A rákos elfajulás kialakulásához mutációk sorozata vezet, mely során a proto-onkogének onkogénekké alakulnak és aktiválódnak illetve a tumorszuppresszor gének inaktiválódhatnak, így a sejtosztódás normális szabályozása felborul. Ha a tumorszuppresszor gének inaktiválódnak vagy géntermékeik elvesztik funkciójukat, a sejtciklus kontrollálatlanná válik, ami malignus elváltozás kialakulásához vezethet. A daganatok kialakulásában szerepet játszó, $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor géneket érintő genetikei és epigenetikai változásokat számos, különböző tumorban megfigyelték, mint például tüdő carcinomában, colorectalis tumorban, melanomában, emlődaganatban, illetve húgyhólyag carcinomában (Belinsky és mtsai, 1998; Esteller és mtsai, 2000; Berggren és mtsai, 2003; Sharpless és Chin, 2003; Kim és mtsai 2005).

A fej-nyaki tumorok tekintetében is a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének és géntermékeik az egyik leggyakrabban tanulmányozott markerek közé tartoznak. Ezen tumorszuppresszor géneket érintő változás lehet deléció, polimorfizmus, mutáció, a heterozigótaság elvesztése (loss of heterozygosity; LOH) vagy a promóter régiójukat érintő metiláció (Ivanchuk és mtsai, 2001). Figyelembe véve, hogy a különböző fej-nyaki daganatok egy meglehetősen heterogén csoportot alkotnak etiológiájuk, szövettanuk, klinikai lefolyásuk és prognózisuk tekintetében, lehetséges, hogy ez a vátozatosság jellemző a tumorszuppresszor géneket érintő változások megjelenési gyakoriságára is. A leggyakoribb, tumorszuppresszor géneket érintő inaktiválódási mechanizmusok közé tartozik a LOH, deléció vagy a promóter metiláció.

A tumorszuppresszor gének teljes funkcióvesztéséhez mindkét alléljuk mutációja szükséges, melyből az egyik általában már öröklötten jelen van, míg a másik mutációja csak később alakul ki. A második allél mutációjával a korábbi heterozigóta állapot elvész, a homozigóta mutáns tumorszuppresszor gén elveszti funkcióját, ami hozzájárulhat a daganatok kialakulásához. Ezt a jelenséget nevezzük a heterozigótaság elvesztésének (LOH). Egy munkacsoportnak laryngealis laphámsejtes carcinomában szenvedő betegek több mint felében sikerült kimutatni a LOH-t, mely a CDKN2A ($p16^{INK4A}$) gént érintette (Smigiel és mtsai, 2004). Shintani és munkacsoportja, illetve Sailasree és munkacsoportja $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ géneket érintő deléciót, mutációt és promóter metilációt is kimutattak OSCC-ben. Eredményeik alapján úgy vélik, hogy a delécióval vagy promóter metilációval történő tumorszuppresszor gén inaktiválódás az egyik leggyakoribb molekuláris esemény a tumorok kialakulásában, melyek hatással lehetnek a betegség kimenetelére. A $p14^{ARF}$ főként metilációval, míg a $p16^{INK4A}$ homozigóta delécióval és promóter metilációval inaktiválódik OSCC-ben (Shintani és mtsai, 2001; Sailasree és mtsai, 2008). Ellentétben a genetikai változásokkal (mutáció, deléció), a DNS metiláció sokkal dinamikusabb és gyakran reverzibilis változás, ezért sokak szerint lehetséges célpontja lehet az új terápiás ágenseknek. A fej-nyaki tumorok epigenetikai profiljának feltérképezése magában rejti a specifikus biomarkerek azonosításának lehetőségét, mely a későbbiekben segítheti a betegség korai diagnózisát, prognosztizálását illetve a terápiás döntéshozatalt (Al-Kaabi és mtsai, 2014). Munkánk során ezért esett választásunk a daganatok kialakulása szempontjából fontos, INK4A/ARF lókuszon elhelyezkedő $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ génekre. Kíváncsiak voltunk arra, hogy fej-nyaki tumorban szenvedő kelet-magyarországi populáció esetén milyen genetikai és epigenetikai változások történnek az említett génekben.

2.6. Célkitűzések

Az irodalmi adatokat összevetve, az Epstein-Barr vírus prevalenciája és így feltételezhető etiológiai szerepe az orális laphámsejtes carcinomában földrajzi régiók szerint igen nagy változatosságot mutat. Néhány populációban (Japán, Kína, Dél-Afrika) végzett vizsgálat szerint az EBV szerepet játszhat az OSCC kialakulásában, míg mások szerint a szerepe kevésbé valószínű. Ismereteink szerint az EBV előfordulását OSCC-ben szenvedő magyar populációban még nem vizsgálták. Továbbá, mivel a tumorok kialakulásában a celluláris folyamatokban bekövetkező változások is részt vesznek, megvizsgáltuk a tumorszuppresszor géneket érintő aberrációkat is fej-nyaki daganatokban.

Mindezek alapján az alábbi feladatokat végeztük el:

- Megvizsgáltuk az EBV prevalenciáját OSCC-ben illetve premalignus elváltozásokban (OL és OLP) szenvedő betegek kelet-magyarországi populációjában. Az EBV lehetséges etiológiai szerepének vizsgálatához a betegek egészséges nyálkahártyájáról gyűjtött mintájában is vizsgáltuk a vírus jelenlétét, valamint a kapott adatokat egészséges kontroll csoport eredményeivel vetettük össze.
- Munkánk második felében a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és epigenetikai (promóter metilációs) változásainak gyakoriságát vizsgáltuk kelet-magyarországi régióból származó fej-nyaki daganatos betegekben, melyek ismert virológiai (HPV és EBV) státusszal rendelkeztek. A kapott eredményeket szintén összehasonlítottuk az egészséges populáció eredményeivel.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegcsoportok

Vizsgálati mintáinkat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Fogorvostudományi Karának Arc-, Állcsont és Szájsebészeti, valamint Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájáról gyűjtöttük 2001 és 2007 közötti időszakban. Az egészséges kontroll csoport mintáit a Parodontológiai Tanszékről gyűjtöttük ugyanezen időszakban. Mintáink újonnan diagnosztizált páciensektől származtak és a betegek sem kemo-, sem radioterápiában nem részesültek a műtéti beavatkozás és a mintavétel előtt. A minták hisztopathológiai vizsgálatának eredményei rendelkezésünkre álltak. A vizsgálatba bevont személyek beleegyező nyilatkozatot írtak alá, valamint a mintavétel a Klinikai Etikai Bizottság jóváhagyásával történt (azonosító szám: 2273-2004).

Kutatásunk első részében az Epstein-Barr vírus prevalenciáját vizsgáltuk orális malignus és premalignus elváltozásokban. Vizsgálati anyagként 65 orális laphámsejtes carcinomában (OSCC) szenvedő beteg (51 férfi, 14 nő; átlagéletkor: 54,4 év, 25-80 év) primer tumorának centrális részéről származó szövetmintáját, valamint klinikailag egészséges nyálkahártyájáról származó exfoliált sejtjeit használtuk. A rákmegelőző állapotok EBV hordozásának vizsgálatához 116 orális lichen planusban (OLP; 29 férfi, 87 nő; átlagéletkor: 55 év, 23-79 év) és 44 orális leukoplakiaban (OL; 14 férfi, 30 nő; átlagéletkor: 56,3 év, 29-91 év) szenvedő betegtől gyűjtöttünk mintákat. Ezen betegektől a lézióról, illetve a léziótól legtávolabb eső klinikailag egészséges buccalis nyálkahártyáról gyűjtöttünk exfoliált sejteket citológiai kefe segítségével.

A műtéti beavatkozás után a betegek sorsát átlagosan 31 hónapig (1,5-60 hónap) követtük nyomon. A betegek neme és életkora mellett adatokat gyűjtöttünk dohányzási és alkoholfogyasztási szokásaikról, feljegyeztük a tünetmentes túlélés időtartamát, a recidívák megjelenésének és metasztázisok diagnosztizálásának időpontját. Összegyűjtöttük a tumorok klinikopathológiai jellemzőire (lokalizáció; TNM [Tumor-Node-Metastasis] állapot; hisztológiai fokozata) vonatkozó adatokat is. A betegcsoportok adatait egy 68 főből álló egészséges kontroll csoport (16 férfi, 52 nő; átlagéletkor: 52,5 év, 22-77 év) adataival vetettük össze. A kontroll csoport tagjait a Fogorvostudományi Karon rutin fogászati szűrésen megjelent páciensekből válogattuk ki, akiktől a betegcsoportokhoz hasonlóan, citológiai kefe segítségével exfoliált sejteket gyűjtöttünk a buccalis nyálkahártyáról. Kórtörténetükben nem szerepelt szájüregi megbetegedés és malignus elváltozás. Az exfoliált sejtek gyűjtését fiziológiás sóoldattal való szájöblítés előzte meg, így minimálisra csökkentettük a nyállal való

kontamináció esélyét. A mintavételt követően a műtéti szövetmintákat és az exfoliált sejteket azonnal 1 ml hűtött RNA later (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) stabilizáló oldatba helyeztük és feldolgozásig -70˚C-on tároltuk.

További munkánk során összesen 65 fej-nyaki régiót érintő tumoros beteg szövetmintájában vizsgáltuk a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és epigenetikai változásokat. A fej-nyaki laphámsejtes carcinomás betegcsoportba (head and neck squamous cell cancer, HNSCC) 37 OSCC-ben (28 férfi, 9 nő, átlagéletkor: 54,5 év, 39-80 év) és 28 laryngealis laphámsejtes carcinomában (laryngeal squamous cell cancer, LSCC) (27 férfi, 1 nő, átlagéletkor: 56,8 év, 43-71 év) szenvedő beteg tartozott. A kontroll csoport mintáit 68 egészséges egyén (16 férfi, 52 nő, átlagéletkor: 52,4 év, 22-77 év) buccalis nyálkahártyájáról származó exfoliált sejtek alkották.

3.2. Immunhisztokémia

Az Epstein-Barr vírus látens membránproteinjét (LMP-1) immunhisztokémiai vizsgálattal mutattuk ki, a Dako-Cytomation LSAB+ System AP Kit (Dako Denmark, Glostrup, Denmark) segítségével, követve a protokoll leírását. Az immunhisztokémiai vizsgálatot a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetben végezték. Pozitív kontrollként egy EBV pozitív, negatív kontrollként egy EBV negatív Hodgkin-lymphomás beteg nyirokcsomójából származó metszetet használtak.

3.3. DNS izolálás

A betegekből származó tumor szövetekből és exfoliált sejtekből történő DNS kivonást TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) oldattal végeztük. A fagyasztott tumor szövetet steril dörzscsészében kvarchomokkal homogenizáltuk, majd hozzáadtunk 1,5 ml TRI Reagent-et és Eppendorf-csövekben 10 percig -70°C-on tartottuk. Ezt követően a mintákat rázógépen rázatva lassan felolvasztottuk, majd a sejtszuszpenziót lecentrifugáltuk (15 perc, 13000g, 4°C). A felülúszóhoz 200 µl kloroformot adtunk; 5-10 percig tartó inkubálás, majd centrifugálás (15 perc, 13000 rpm, 4°C) után a felülúszó három fázisra vált szét: az RNS-t tartalmazó vizes, a fehérje frakciót tartalmazó szerves fázisra, valamint a DNS tartalmú interfázisra. Az interfázisból a DNS-t 300 µl 96%-os etanol hozzáadásával csaptuk ki. Az alkohol hozzáadása után az oldatot 2-3 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd újból centrifugáltuk (15 perc, 13000g, 4°C). Az üledéket 1 ml 0,1 M nátrium-citrát és 10%-os etanol keverékével kétszer mostuk (30 perc inkubáció szobahőmérsékleten, centrifugálás 5 perc, 13000g, 4°C). Végül a DNS üledéket 75%-os etanollal mostuk, centrifugáltuk és

szárítottuk. A DNS-t 8 mM nátrium-hidroxid oldatban (20 µl NaOH + 4 µl 0,1 M HEPES) oldottuk vissza. A mintákat 4°C-on, hosszabb ideig -20°C-on tároltuk.

A premalignus elváltozásokról és az egészséges kontroll csoporttól származó exfoliált sejteket tartalmazó citológiai keféket 1 ml PBS puffert (phosphate buffered saline) tartalmazó csövekbe helyzeték. A DNS izolálás első lépéseként a citológiai keféről az exfoliált sejteket lerázattuk, majd a mintavevő pálcát eltávolítottuk a sejtszuszpenzióból és a sejteket lecentrifugáltuk (5 perc, 400 g, 20°C), a sejtüledéket pedig 150 µl TNE pufferben (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) vettük fel. A sejteket 50°C-on, 3 órán keresztül emésztettük 10 µl 10% SDS és 5 µl 10 mg/ml-es proteináz K elegyével. Az emésztés után 80 µl 5 M NaCl oldattal kezeltük, vortexeltük, majd centrifugálás után (15 perc, 12000 g, 4°C) a felülúszóhoz 96%-os etil-alkoholt adtunk és 1 órán át -20°C-on inkubáltuk. Végül újabb centrifugálás után a DNS üledéket 70%-os etanollal mostuk, majd szárítottuk. A DNS-t 30 µl TE pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 7,5) oldottuk vissza.

3.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-ben használt primerek szekvenciáit, a reakciók hőmérsékleti profiljait illetve a PCR termékek méreteit a 3. számú táblázat foglalja össze.

A DNS integritásának és amplifikálhatóságának ellenőrzése a humán β-globin gén 110 bp hosszúságú szakaszát amplifikáló pCO3 és pCO4 primerek segítségével történt. A β-globin PCR-t 25 µl végtérfogatban végeztük az alábbi komponensekkel: 1x GoTaq puffer, 100-100 µM dNTP, 12,5-12,5 pmol primer, 1 U GoTaq polimeráz (Promega, Madison, WI, USA) és 2 µl (0,1-0,3 µg) templát DNS.

Az EBV genomjának detektálását nested PCR-rel végeztük, a vírus BamHI-W fragment internális ismétlődő régiójára specifikus primerek segítségével. A nested PCR első körében 171 bázispár nagyságú szakaszt szaporítottunk fel, a második körben egy 97 bázispár hosszúságú szakaszt amplifikáltunk az előző fragmenten belül. A reakcióelegy 25 µl végtérfogatú volt, összetétele a következő: 1x GoTaq puffer, 250-250 µM dNTP, 25-25 pmol primer, 0,5 U GoTaq polimeráz és 2 µl (0,1-0,3 µg) templát DNS. Pozitív kontrollként a B95-8 EBV pozitív sejtvonal DNS-ét használtuk.

Az INK4A/ARF lókuszon elhelyezkedő $p14^{INK4A}$ és $p16^{ARF}$ tumorszuppresszor gének exonjainak kimutatásához korábban leírt primerpárokat használtunk (Baur és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2000; Nagy és mtsai, 2003). A PCR elegy összetétele ugyanaz volt, mint az EBV PCR esetén.A PCR termékeket minden esetben etidium-bromid tartalmú, 1,5%-os agaróz gélben elektroforetizáltuk (110 V, 60 perc), majd UV fény alatt tettük láthatóvá.

3.5. Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP)

Az általunk vizsgált tumorszuppresszor génekben esetlegesen bekövetkező genetikai változásokat (genetikai polimorfizmusok, mutációk, deléciók vagy inszerciók) SSCP analízissel (single-stranded conformation polymorphism, egyszálú konformációs polimorfimus) vizsgáltuk. Az SSCP igen érzékeny elektroforetikus módszer, azonban a rendszer érzékenysége fordítottan arányos a vizsgált DNS szakaszok hosszával. Ezért az SSCP analízis előtt, az előzőleg leírt PCR-ek segítségével amplifikált exon szakaszokat restrikciós emésztésnek vetettük alá. A p16 exon 1 és exon 2-t SmaI restrikciós enzimmel (Fermentas, Vilnius, Lithuania) emésztettük 25°C-on, 3 órán át; a p14 exon 1-et DdeI enzimmel (Promega, Madison, WI, USA) hasítottuk 37°C-on, 3 óráig. A p16 harmadik exonját nem emésztettük.

A hasított termékek 6 µl-éhez 24 µl 95%-os formamid/0,05% xilén-cianol/0,05% brómfenolkék elegyét adtuk. A mintákat 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégen gyorsan lehűtöttük. A denaturált DNS szálakat 18%-os poliakrilamid gélen futattuk 4°C-on 4-6 órán át 300 V feszültségen. Kontrollként primer keratinocyta és humán fibroblast sejtek DNS-ét használtuk. Az elektroforézist követően a DNS szakaszokat az ezüst-festés standard protokollját követve tettük láthatóvá, mely során a gélt 10% etanol/ 0,5% ecetsav tartalmú oldattal fixáltuk, majd 0,1%-os $AgNO_3$ oldattal festettük. Az előhívást 1,5%-os NaOH oldattal végeztük.

A SSCP analízist szűrő rendszerként alkalmaztuk a genetikai eltéréseket mutató minták szelektálására. A genetikai változások pontosabb meghatározása érdekében, a kontrolltól eltérő futási mintázatot mutató mintákat szekvenáltattuk.

3.6. Szekvenálás

Az SSCP alapján futási eltérést mutató minták szekvenálását a DE OEC Klinikai Genomika Központban, az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft végezte. Az exonok amplifikációját és gélelektroforézisét követően a PCR termékeket EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc., East Markham Ontario, Canada) segítségével izoláltuk a gélből, a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított PCR termék szekvenálását BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) végezték, az amplifikációhoz használt primerekkel. A reakció ABI 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készülékben ment végbe. Minden exont két független PCR-rel amplifikáltuk, szekvenálásuk két irányból, két ismétlésben történt. A szekvenciákat a GenBank adatbázisban található referencia szekvenciával hasonlítottuk össze (Génbanki azonosító: NG007485). A heterozigóta

eltéréseket klónozással és újabb szekvenálással ellenőriztük. A PCR termékek klónozása a pGEM-T Easy Vector Sytem (Promega Madison, WI, USA) segítségével történt a protokollt követve. A transzformált sejtekből a plazmidot PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) segítségével izoláltuk, a gyártó leírása szerint. Az inzertált DNS fragment szekvenálása az előbb leírtak szerint zajlott.

3.7. Metiláció-specifikus polimeráz láncreakció (MSP)

A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének promótereinek metilációját Herman és munkatársai által korábban leírt metiláció-specifikus PCR-rel vizsgáltuk (Herman és mtsai, 1996). A metilált és nem metilált promóterek megkülönböztetésére a mintákat Na-biszulfitos oldattal módosítottuk. A módosítás során a nem metilált promóterben a citozin uracilra cserélődik, míg a metilált promóterben változatlan marad. Így a metilált és nem metilált promóterek a megfelelő primerpárok alkalmazásával megkülönböztethetők. A kezelés során 1 µg DNS-t tartalmazó mintához NaOH-ot adtunk 0,3 M végkoncentrációban, majd 42°C-on, 20 percig denaturáltuk. A denaturált DNS-hez 3,8M Na-biszulfit/1 mM hidrokinon (pH:5) oldatot adtunk és 55°C-on 16 órán át inkubáltuk. Végül a módosított DNS-t Wizard Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) segítségével tisztítottuk, követve a protokoll leírást. Az etanolos kicsapást követően a DNS-t desztillált vízben oldottuk vissza.

A 25 µl végtérfogatú metiláció-specifikus PCR elegy összetétele a következő volt: 1x AmpliTaq Gold puffer, 250-250 µM dNTP, 25-25 pmol primer, 0,5 U AmpliTaq Gold polimeráz (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és 2 µl (0,1-0,3 µg) templát DNS. A primerek szekvenciája, valamint a PCR hőmérsékleti profilja az 3. táblázatban látható. A metilált promóter pozitív kontrolljaként BL41 (CRL-2323) és Ramos (CRL-1596), a nem metilált promóterek kontrollként Namalwa (CRL-1432) BL-ás sejtvonal DNS-t használtunk.

3.8. Statisztikai elemzés

Az EBV prevalencia adatokat, a tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és epigenetikai változások gyakoriságát khi-négyzet és Fischer egzakt teszt segítségével értékeltük, az EBV esetleges prognosztikai szerepét logisztikus regresszióval elemeztük. Az EBV pozitivitás tünetmentes túlélésre gyakorolt hatását Kaplan-Meier teszttel vizsgáltuk. A statisztikai analízis SPSS 15.0 for Windows statisztikai programmal készült, 95% konfidencia intervallum mellett. Szignifikánsnak tekintettük az eredményt, ha $p<0,05$.

3. táblázat. A polimeráz láncreakcióban használt primerek szekvenciái valamint az alkalmazott hőmérsékleti profilok.

PCR	Primer neve	Primer szekvenciája (5'→3')	PCR termék mérete	Hőmérsékleti profil
β-globin	pCO3 pCO4	5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3' 5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'	110 bp	94°C 2 min 94°C 1 min 55°C 1,5 min 72°C 1,5 min } 30x 72°C 2 min
EBV (nested)	EBV	5'-GAGACCGAAGTGAAGGCCCT-3' 5'-ACAGCTCCTAAGAAGGCACC-3'	171 bp	94°C 5 min 94°C 30 sec 58°C 30 sec 72°C 30 sec } 35x 72°C 5 min
	EBV-B	5'-GCCAGAGGTAAGTGGACTTT-3' 5'-GAGGGGACCCTGAGACGGGT-3'	97 bp	
INK4A/ARF	$p14^{ARF}$ exon1	5'-CTGCTCACCTCTGGTGCCAA-3' 5'-TCTCCTCCTCCTCCTAGCCT-3'	367 bp	94°C 3 min 94°C 1 min 56-63°C 1 min 72°C 1 min } 35x 72°C 7 min
	$p16^{INK4A}$ exon1	5'-GGAGGAAGAAAGAGGAGGG-3' 5'-ACTTCGTCCTCCAGAGTCG-3'	316 bp	
	$p16^{INK4A}$ exon2	5'-GCTCTGACCATTCTGTTCTC-3' 5'-CTCAGATCATCAGTCCTCAC-3'	355 bp	
	$p16^{INK4A}$ exon3	5'-GTAGGGACGGCAAGAGA-3' 5'-ACCTTCGGTGACTGATG-3'	159 bp	
MSP	$p14^{ARF}$ nem metilált	5'TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT-3' 5'-CACAAAAACCCTCACTCACAACAA-3'	132 bp	95°C 5 min 95°C 30 sec 62°C 30 min 72°C 30 min } 35x 72°C 4 min
	$p14^{ARF}$ metilált	5'-GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC-3' 5'-AAAACCCTCACTCGCGACGA-3'	122 bp	
	$p16^{INK4A}$ nem metilált	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'	151 bp	
	$p16^{INK4A}$ metilált	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'	150 bp	

EBV: Epstein-Barr vírus; PCR: polimeráz láncreakció; MSP: metiláció specifikus PCR.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az EBV előfordulási gyakorisága a vizsgált betegcsoportokban

A kontroll csoportban az EBV gyakorisága 19,1% (13/68) volt. A vizsgált betegcsoportok közül az OSCC betegek tumorszövetének 73,8%-ban (48/65), míg az OL és OLP betegcsoportok léziójában 29,5% (13/44) és 46,6%-ban (54/116) tudtuk kimutatni az EBV DNS-t. A klinikailag egészséges nyálkahártyáról származó mintákban az EBV gyakorisága 66,2% (43/65) volt az OSCC betegeknél, 22,7% (10/44) az OL betegcsoportban és 31,9% (37/116) az OLP-ben szenvedő betegek körében.

A betegcsoportok egészséges nyálkahártyájának EBV hordozását megvizsgáltuk a lézió EBV pozitivitásának függvényében is. A betegeket léziójában EBV pozitív és negatív csoportokra osztottuk. Ez alapján a léziójában pozitív OSCC, OL és OLP betegek egészséges nyálkahártyájának 70,8% (34/48), 38,5% (5/13) és 53,7%-ában (29/54) tudtunk EBV DNS-t kimutatni. Az EBV negatív léziójú betegek klinikailag egészséges nyálkahártyája 52,9% (9/17), 16,1% (5/31) és 12,9%-ban (8/62) volt EBV pozitív az OSCC, OL és OLP csoportokban.

Ha OLP betegcsoportot a léziók klinikai megjelenése szerint kettéosztottuk erozív és atrófiás (EA-OLP) illetve nem-EA-OLP (plakk szerű és retikuláris) csoportokra és megvizsgáltuk az EBV prevalenciáját; hasonló eredményeket kaptunk a két csoportban mind a léziót (EA-OLP vs. nem-EA-OLP; 47,5%, 28/59 vs. 45,6%, 26/57) mind pedig az egészséges nyálkahártyát (EA-OLP vs. nem-EA-OLP; 30,5%, 18/59 vs. 33,3%, 19/57) illetően.

4.2. Az EBV prevalencia adatainak statisztikai elemzése

A kapott prevalencia adatok statisztikai összehasonlítását a 4. és a 5. számú táblázat foglalja össze. Az adatokat összevetve az OSCC betegcsoport léziójában és egészséges nyálkahártyájában is szignifikánsan magasabb volt az EBV hordozás gyakorisága, mint a kontroll és a két premalignus elváltozást mutató csoportban. Az OLP esetén a lézióban szignifikánsan magasabb volt az EBV pozitivitás aránya összehasonlítva a kontroll és az OL csoporttal.

Az EBV negatív lézióval rendelkező betegcsoportokban csak az OSCC betegek egészséges nyálkahártyájának EBV pozitivitása mutatott szignifikáns eltérést mind a kontrollhoz, mind pedig a két premalignus elváltozáshoz képest.

4. táblázat. Az Epstein-Barr vírus gyakoriságának statisztikai összehasonlítása a vizsgált betegcsoportokban.

	Lézió			Klinikailag egészséges nyálkahártya		
	OLP (n=116)	OL (n=44)	OSCC (n=65)	OLP (n=116)	OL (n=44)	OSCC (n=65)
Kontroll (n=68)	p<0,001	NSZ	p<0,001	NSZ	NSZ	p<0,001
OLP (n= 116)		p=0,049	p<0,001		NSZ	p<0,001
OL (n=44)			p<0,001			p<0,001

OLP: orális lichen planus; OL: orális leukoplakia; OSCC: oral squamous cell cancer, orális laphámsejtes carcinoma, NSZ: nem szignifikáns

Az EBV pozitív elváltozással rendelkező OSCC betegek nyálkahártyájának EBV hordozása csak a kontrollhoz és az OL csoporthoz képest volt szignifikánsan magasabb, valamint szignifikánsan magasabb volt a léziójában pozitív OLP betegek egészséges nyálkahártyájának EBV pozitivitása is a kontroll csoporttal összevetve.

5. táblázat. Az Epstein-Barr vírus gyakoriságának statisztikai összehasonlítása a vizsgált betegcsoportok egészséges nyálkahártyájában.

	EBV pozitív betegek egészséges nyálkahártyája				EBV negatív betegek egészséges nyálkahártyája		
	OLP (n=54)	OL (n=13)	OSCC (n=48)		OLP (n=62)	OL (n=31)	OSCC (n=17)
Kontroll (n=68)	p<0,001	NSZ	p<0,001	Kontroll (n=68)	NSZ	NSZ	p=0,010
OLP (n=54)		NSZ	NS	OLP (n=62)		NSZ	p=0,001
OL (n=13)			p=0,050	OL (n=31)			p=0,018

OLP: orális lichen planus; OL: orális leukoplakia; OSCC: oral squamous cell cancer, orális laphámsejtes carcinoma, NSZ: nem szignifikáns

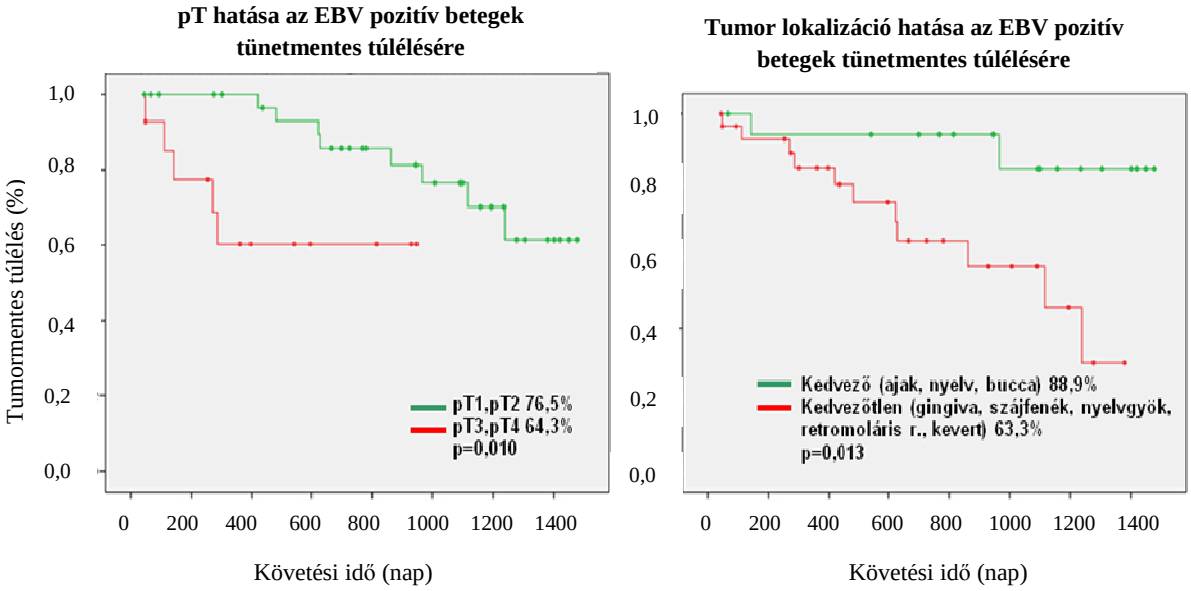
4.3. Immunhisztokémia

Minden EBV pozitív OSCC beteg (n=48) paraffinba ágyazott tumorszövet metszetén elvégezték a vírus LMP-1 fehérjéjének immunhisztokémiai kimutatását. Azonban a 48 OSCC tumor minta közül egyikben sem tudták kimutatni az LMP-1 fehérjét.

4.4. Az EBV és a klinikopatológiai jellemzők összefüggésének vizsgálata

A statisztikai elemzés során nem találtunk szignifikáns összefüggést az EBV pozitív és negatív OSCC csoportok között a betegek életkora, neme, a rizikó faktorok (dohányzás, alkoholfogyasztás) vagy a tumor klinikopatológiai adatai (lokalizáció, TNM, hisztológiai fokozat) tekintetében. A vírus jelenléte a lézióban vagy az egészséges nyálkahártyában nem befolyásolja a túlélést és nem vezetett rosszabb prognózishoz. A teljes OSCC csoportban a

tumor mérete (azaz a TNM klasszifikáción belül, a tumoros invázió mértékét és/vagy kiterjedtségét meghatározó besorolás) szignifikánsan rontotta a betegség tünetmentes túlélését (p=0,011). Továbbá, a léziójában EBV pozitív OSCC betegek körében a tumor magasabb T stádiuma (p=0,010) és a daganat kedvezőtlen lokalizációja (p=0,013) is csökkentette a betegek tünetmentes túlélését.



7. ábra. A léziójában EBV pozitív betegek tünetmentes túlélése a tumor T stádiumának (A. ábra) illetve a tumor lokalizációjának (B. ábra) függvényében. (pT: pathologiás tumor mérete, a %-os adatok a betegek túlélését mutatják)

Az OL betegeknél az 55 év alatti életkor rizikófaktornak tekinthető a lézió vírushordozása szempontjából (p=0,047). Az OLP csoportban az EBV jelenléte gyakoribb a férfiakban, mint a nőkben (p=0,02), azonban az életkor és a vírushordozás között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Továbbá az EBV hordozás nem befolyásolja az OLP kedvezőtlenebb klinikai formájának (EA-OLP) megjelenését sem.

4.5. A tumorszuppresszor gének genetikai változásainak vizsgálata

A kontroll csoportban összesen négy egyénnél mutattunk ki egy vagy több exont érintő deléciót. Egy esetben detektáltuk a p16 exon 1α hiányát és egy esetben pedig exon 2 deléciót. Két egyénnél két-két exon amplifikációja volt sikertelen (p16 exon 1α és 2, illetve p14 exon 1β és p16 exon 3). Az OSCC betegcsoportban csak egy betegnél nem sikerült a p16 exon 1α kimutatása. Az LSCC csoportban összesen 21 egyénnél (75%) volt sikertelen a $p16^{INK4A}$ gén egy vagy több exonjának amplifikációja. Az egyes exonokra lebontva 19 esetben mutattunk ki exon 1α, kilenc esetben exon 2 és két esetben az exon 3 hiányát, míg 10

esetben (35,7%) a $p14^{ARF}$ gén exon 1β hiányát detektáltunk. Az exon delécióval történő inaktivációt tekintve, összességében a $p14^{ARF}$ gént inaktív állapotban találtuk három egészséges egyénben és 14 LSCC-ben szenvedő betegben, míg az OSCC csoportban, egy betegben sem mutattuk ki a $p14^{ARF}$ gén inaktivációját. A $p16^{INK4A}$ gén négy kontrollban, egy OSCC-ben és 21 LSCC-ben szenvedő betegben inaktiválódott. Három egészséges egyénben és 13 LSCC-ben szenvedő betegben figyeltük meg mindkét gén együttes inaktivációját, míg az OSCC csoportban nem volt olyan beteg, melynél mindkét gén egyszerre inaktiválódott volna. A statisztikai elemzések szerint az LSCC betegcsoportban az exonok delécijának gyakorisága szignifikánsan magasabb a kontroll és az OSCC csoport adataihoz képest ($p<0,001$ mindkét esetben).

A szekvencia analízissel két mutációt sikerült kimutatni; az egyik a p16 exon 1α nem kódoló régiójában egy homozigóta nukleotid csere a T24610A pozícióban, a másik ugyanezen exon kódoló régiójának C24702A pozíciójában egy heterozigóta nukleotid csere, mely alanin→aszparagin (Ala13Asp) aminosavcserét eredményez. A mutációkon kívül három polimorfizmust azonosítottunk több mintában is. Az exon 2 kódoló régiójában elhelyezkedő G28575A heterozigóta polimorfizmust négy páciensnél mutattunk ki. Ez a polimorfizmus a 140-es kodonban alanin→threonin (Ala140Thr) aminosavváltozást eredményezett. A G28608A polimorfizmus az exon 2 nem kódoló régióját érinti, melyet négy páciens mintájában mutattunk ki, mindegyik betegnél heterozigótaként jelenik meg ez a polimorfizmus. A harmadik eltérést az exon 3 nem kódoló régiójában találtuk, a G31292C pozícióban, melyet hat páciensben homozigóta, hét betegben pedig heterozigóta polimorfizmusként detektáltuk. A G31292C polimorfizmus mRNS szinten a C540G polimorfizmusnak felel meg. A p16INK4A gént érintő mutációkat és polimorfizmusokat a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat. A $p16^{INK4A}$ gén mutációinak és polimorfizmusainak előfordulása a betegcsoportokban.

Exon		p16 exon1α		p16 exon2		p16 exon3
		NK	K	K	NK	NK
Nukleotid pozíció		24610	24702	28575	28608	31292
Referencia szekvencia (Accession Number NG007485)		T	C	G	G	G
Kontroll	K36			G/A		
OSCC	M03	A				
	M54		C/A			
	M20			G/A		
	M23			G/A	G/A	
	M33				G/A	
	M68				G/A	
	M37					C
	M65					C
	M76					G/C
	M29					G/C
	M30					C
	M71					G/C
LSCC	T67			G/A		
	T38				G/A	G/C
	T12					G/C
	T16					C
	T17					C
	T35					G/C
	T47					G/C
	T54					C
Aminosav csere a kódoló régióban			Ala13Asp	Ala140Thr		

OSCC: oral squamous cell cancer, orális laphámsejtes carcinoma, LSCC: laryngeal squamous cell cancer, laryngealis laphámsejtes carcinoma, NK: nem kódoló region, K: kódoló region.

4.6. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének promóter metilációjának vizsgálata

A $p14^{ARF}$ promóter metilációjának vizsgálata mind a 68 egészséges egyén, 30 OSCC beteg és mind a 28 LSCC beteg esetében volt sikeres, míg a $p16^{INK4A}$ promóterét az összes

kontroll esetében, 29 OSCC és 21 LSCC betegnél sikerült megvizsgálni. Az egészséges kontroll csoportban sem a $p14^{ARF}$ sem pedig a $p16^{INK4A}$ promótere nem volt metilált, azonban a $p14^{ARF}$ promótere részlegesen metilált volt kettő, a $p16^{INK4A}$ promótere pedig három egészséges egyénnél. Összességében a p14 promóter a kontroll csoport 97,1%-ban (66/68), a p16 promóter pedig 95,6%-ban (65/68) volt metilálatlan állapotban.

Az OSCC betegek 86,7%-ban (26/30) a $p14^{ARF}$ promótert nem metilált állapotban találtuk. Három esetben mutattuk ki a $p14^{ARF}$ promóter részleges, míg egy esetben a teljes metilációját. A $p16^{INK4A}$ promótere 20 páciens (69%, 20/29) mintájában volt nem metilált állapotban. Részleges metilációt hat, teljes metilációt három esetben sikerült detektálni. A statisztikai elemzések alapján, az OSCC betegcsoportban a nem metilált, aktív $p16^{INK4A}$ promóter kevésbé gyakori; ez szignifikáns különbséget mutat a kontroll csoporttal összehasonlítva (p=0,001). Az aktív, nem metilált $p14^{ARF}$ promóter is kevésbé gyakori az OSCC csoportban, mint a kontroll csoportban, azonban ez az eltérés nem szignifikáns (p=0,069).

Az LSCC csoportban a $p14^{ARF}$ promótert a betegek 85,7%-ban (24/28) találtuk nem metilált állapotban. Részleges metilációt három, teljes metilációt egy betegnél mutattunk ki. A betegek 76,2%-ban (16/21) volt a $p16^{INK4A}$ promóter metilálatlan, öt beteg mintájában volt a $p16^{INK4A}$ részlegesen metilált, míg teljes $p16^{INK4A}$ promóter metilációt nem mutattunk ki ebben a betegcsoportban. Hasonlóan az OSCC betegcsoporthoz, a $p16^{INK4A}$ gén promóterének metilációs állapota (nem metilált vs. részlegesen/teljesen metilált) szignifikáns eltérést (p=0,016) mutat a kontroll csoporthoz képest, azonban a $p14^{ARF}$ gén metilációs állapotát tekintve az eltérés itt sem szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva (p=0,058). A két betegcsoport metilációs státusza között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik tumorszuppresszor gén tekintetében sem.

Ha a két betegcsoportot (OSCC és LSCC) egy csoportként vesszük figyelembe, mindkét tumorszuppresszor gén tekintetében a nem metilált promóter szignifikánsan kevésbé gyakori az egészséges kontroll csoporthoz képest (p=0,043 a $p14^{ARF}$ esetében; p=0,001 a $p16^{INK4A}$ esetében). Az egészséges kontroll csoportban és a betegcsoportokban megjelenő, tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és promóter metilációs változásokat az 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének genetikei és epigenetikai változásainak megoszlása a különböző betegcsoportokban.

		p14ARF			p16INK4A		
		Kontroll	OSCC	LSCC	Kontroll	OSCC	LSCC
Exon deléció		4,4% (3/68)	ND	50% (14/28)	5,9% (4/68)	2,7% (1/37)	75% (21/28)
Mutáció		ND	ND	ND	ND	5,4% (2/37)	ND
Polimorfizmus		ND	ND	ND	1,5% (1/68)	27% (10/37)	28,6% (8/28)
Promóter metilácó státusza	M	ND	3,3% (1/30)	3,6% (1/28)	ND	10,3% (3/29)	ND
	M/U	2,9% (2/68)	10% (3/30)	10,7% (3/28)	4,4% (3/68)	20,7% (6/29)	23,8% (5/21)
	U	97,1% (66/68)	86,7% (26/30)	85,7% (24/28)	95,6% (65/68)	69% (20/29)	76,2% (16/21)

OSCC: oral squamous cell cancer, orális laphámsejtes carcinoma, LSCC: laryngeal squamous cell cancer, laryngealis laphámsejtes carcinoma, ND: nem detektált, M: metilált promóter, M/U: részlegesen metilált promóter, U: nem metilált promóter.

4.7. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének genetikai változásainak és promótereik metilációjának hatása a betegek tünetmentes túlélésére

Az átlagos tumormentes túlélési idő az OSCC betegcsoport esetén 870 nap (93-1807), az LSCC csoportban 951 nap (167-2988). A statisztikai elemzések alapján az OSCC csoportban a $p16^{INK4A}$ promóter metilációja, az LSCC betegek esetében pedig az exon deléciók előfordulása rövidebb tumormentes túléléshez vezet, azonban egyik tényező hatása sem volt statisztikailag szignifikáns (p=0,108 és p=0,054 volt OSCC és LSCC esetén).

5. MEGBESZÉLÉS

A fej-nyaki daganatok közé tartozó orális laphámsejtes carcinoma (OSCC) kialakulását befolyásoló sokféle etiológiai tényező közül elsősorban a dohányzás és az alkoholfogyasztás emelhető ki. Azonban nem dohányzó és alkoholt nem fogyasztó egyénekben is kialakulhat a betegség (Ščėsnaitė és mtsai, 2008). Ez a tény további faktorok szerepét veti fel, melyek növelhetik a tumor kialakulásának kockázatát. Ezek a rizikótényezők lehetnek például az egyes népcsoportokra jellemző bételrágás, táplálkozási szokások, továbbá a rossz szájhigiéne, krónikus fogágybetegségek, gombás fertőzések valamint az onkogén vírusinfekciók (HPV, EBV) (Sand és mtsai, 2002; Chen és mtsai, 2008; Curado és Hashibe, 2009; Szarka és mtsai, 2009). Mindemellett az orális tumorok kialakulásában nemcsak exogén, hanem endogén faktorok (genetikai fogékonyság, celluláris folyamatok zavara) is részt vehetnek. A malignus folyamatok kialakulása szempontjából leggyakrabban a retinoblasztóma és a p53 útvonal érintett (Macleod, 2000). Ezen útvonalban szerepet játszó $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének és géntermékeik az egyik leggyakrabban tanulmányozott markerek közé tartoznak a fej-nyaki tumorok tekintetében. A fej-nyaki tumorokra specifikus, különböző biomarkerek azonosítása, valamint genetikai/epigenetikai profiljuk feltérépezése segítheti a korai dignózist, a betegség prognosztizálását vagy a későbbiekben új terápiás célpontokat jelenthetnek (Al-Kaabi és mtsai, 2014).

A tumorvírusok közül a HPV különböző típusait a méhnyakrák etiológiai tényezőjeként tartják számon, valamint szerepük valószínűsíthető fej-nyaki daganatokban is (Döbrőssy, 2005; Szarka és mtsai, 2009; Faridi és mtsai, 2011). Az EBV-t különböző lymphoid és epithelialis daganatokkal hozták összefüggésbe. A lymphoid eredetű Burkitt-lymphoma endemikus fomája, valamint az epithelialis eredetű nasopharyngealis carcinoma nem keratinizált formája csaknem 100%-os EBV pozitivitást mutat (Michelow és mtsai, 2012).

Az Epstein-Barr vírus szerepe tehát egyes tumorok esetén már bizonyítottnak látszik, azonban a különböző irodalmi adatok alapján etiológiai szerepe a szintén epithelialis eredetű orális laphámsejtes carcinomában illetve a különböző, szájüreget érintő premalignus elváltozásokban még vitatott (Atula és mtsai, 1997; Cruz és mtsai, 1997; Higa és mtsai, 2002; Kobayashi és mtsai, 1999). Az EBV OSCC-ben betöltött etiológiai szerepének megítélésében mutatkozó különbségek adódhatnak a vizsgált betegpopuláció nagyságából, a különböző népcsoportok (rasszok) EBV fertőzés iránti fogékonyságában mutatkozó eltérésekből,

valamint a betegek immunológiai állapotának különbségeiből, illetve az alkalmazott detektálási technikák eltérő érzékenységéből.

Míg az észak-amerikai, dél-afrikai és nyugat-európai populációban nem valószínű, hogy a vírus részt vesz a betegség kialakulásában, addig néhány japán és kínai populációban elvégzett vizsgálat alapján ezeken a földrajzi területeken valószínűsítik az EBV etiológiai szerepét az OSCC patogenezisében (Van Rensburg és mtsai, 1995; Cruz és mtsai, 2000; Higa és mtsai, 2002; Higa és mtsai, 2003; Goldenberg és mtsai, 2004).

Az alacsony EBV prevalenciáról beszámoló munkacsoportok szerint az EBV-nek nincs vagy csak elhanyagolható etiológiai szerepe van a betegség kialakulásában. Atula és munkatársai valamint Kobayashi és munkatársai különböző fej-nyaki tumorokból származó mintákban vizsgálták az EBV jelenlétét Southern blot hibridizációs (SBH) technikával és PCR-rel. Atula és munkacsoportja a fej-nyaki epithelialis tumorokból származó szövetminták egyikében sem mutatott ki EBV DNS-t SBH technikával, míg a Kobayashi és munkacsoportja által vizsgált 46 OSCC-ből származó szövetminta közül mindössze hét bizonyult EBV pozitívnak PCR és SBH módszer alkalmazásával. Az EBV pozitív minták közül hatban sikerült kimutatni a vírus LMP-1 fehérjéjét immunhisztokémiai vizsgálattal, azonban a vírus EBER-1 RNS-ének kimutatása *in situ* hibridizációval (ISH) sikertelennek bizonyult (Atula és mtsai, 1997; Kobayashi és mtsai, 1999).

Bár Mao és munkatársai az OSCC-ben szenvedő betegek 50%-ában detektált EBV-specifikus szekvenciákat az orális mucosáról származó exfoliált sejt mintákban, a vírus DNS előfordulását mindössze hét beteg (35%, 7/20) tumorfelszínről származó mintájában sikerült kimutatni (Mao és mtsai, 1993).

Ezekkel az adatokkal ellentétben több kutatócsoport magas EBV prevalencia adatokról számol be, mely alapján a vírusnak kóroki szerepet tulajdonítanak a daganatképződésben. Japán tanulmányok egy olyan területről származó betegpopulációt vizsgálva, ahol a nasopharyngealis carcinoma is gyakori, OSCC-ben szenvedő beteg körében több mint 70%-os (39/54) EBV DNS pozitivitást mutattak ki (Higa és mtsai, 2002; Higa és mtsai, 2003). Cruz és munkatársai 1997-ben publikált tanulmányukban az alkalmazott, különböző érzékenységű, EBV-re specifikus primerpároktól függően 100% illetve 50%-os EBV pozitivitást találtak OSCC betegmintákban. Bár véleményük szerint a vírus megjelenése a tumoros mintákban inkább a betegek immunszupprimált állapotának köszönhető, nem zárják ki az EBV etiológiai szerepét sem a szájüregi laphámrákok kialakulásában (Cruz és mtsai, 1997).

Néhány esetben immunhisztokémiai vizsgáló módszereket is alkalmaztak a vírus fontosabb fehérjéinek kimutatására, hogy megerősítsék, vagy éppen cáfolják az EBV

lehetséges szerepét a szájüregi tumorokban. Shamaa és csoportja az OSCC minták 81,8%-ában mutatta ki az EBV LMP-1 fehérjéjét. Eredményeik alapján közvetlen kapcsolatot feltételeznek az EBV fertőzés és az orális laphámrák kialakulása, malignus transzformációja között (Shamaa és mtsai, 2008).

Gonzalez-Moles és munkatársai ugyan csak 19,2%-os (15/78) EBV DNS előfordulási gyakoriságot mutattak ki OSCC betegek körében, ezen minták 85,7%-ában sikerült detektálniuk a vírus LMP-1 fehérjéjét is, melyek alapján feltételezhető, hogy a vírus látens formában van jelen a lézió területén. Az 50 főből álló egészséges orális mucosával rendelkező kontroll csoportjukban EBV pozitív esetet nem találtak (Gonzalez-Moles és mtsai, 2002).

Munkacsoportunk magas, a kontroll és a premalignus betegcsoportjainktól szignifikánsan eltérő EBV DNS pozitivitást (73,8%, 48/65) mutatott ki az OSCC betegcsoport tumorszövetből származó mintáiban, amely összevethető azoknak a tanulmányoknak az adataival, melyek a vírus etiológiai szerepét feltételezik az OSCC kialakulásában (Higa és mtsai, 2002; Higa és mtsai, 2003; Shamaa és mtsai, 2008).

Az EBV szerepének megítéléséhez vizsgáltuk az LMP-1 virális protein expresszióját immunhisztokémiai módszerrel, de egyetlen EBV pozitív OSCC tumorszövet mintában sem tudtuk kimutatni az LMP-1 proteint. Hasonló eredményekről számoltak be Horiuchi és munkatársai, akik bár az OSCC-ben szenvedő betegek többségében EBV DNS-t mutattak ki, azonban a vírus LMP-1 proteinjét nem sikerült egyetlen mintában sem detektálniuk (Horiuchi és mtsai, 1995). Korábbi vizsgálataik folytatásaként az EBV etiológiai szerepének megítélésére, Cruz és munkacsoportja EBV pozitív OSCC mintákban ugyancsak vizsgálta a vírus különböző transzkriptumainak és fehérjéinek expresszióját. Az alkalmazott érzékeny technikák (ISH; PCR, reverz transzkriptáz PCR; izotermális amplifikáció (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA); immunhisztokémia) ellenére azonban egy minta sem bizonyult egyértelműen pozitívnak a vizsgált virális markerekre (EBER, EBNA-1, EBNA-2, LMP-1, LMP-2, BHRF-1, BARF0 transzkriptumok, EBNA-1, LMP-1 és ZEBRA proteinek) nézve. Eredményeik alapján úgy vélik, hogy bár minden mintában megtalálható az EBV DNS, feltehetően az transzkripciós szempontból inaktív formában van, ezért a vírusnak nincs aktív, kóroki szerepe az orális carcinogenesis folymatában. Újabb eredményeik alapján azt feltételezik, hogy az OSCC-ben szenvedő páciensek esetében – a tumor következtében kialakuló immunszupprimált állapot miatt - a vírus nagyobb mennyiségben léphet ki a nyálba anélkül, hogy jelenléte ok-okozati összefüggésben lenne magával a betegséggel. (Cruz és mtsai, 2000).

8. táblázat. A vizsgált betegcsoportok EBV prevalencia adatai földrajzi régiónként.

Szerző	Földrajzi régió	Betegcsoport (n)	Kontroll (n)	Alkalmazott technika	EBV DNS pozitivitás	Más markerek
Atula és mtsai (1997)	Finnország	HNC (79)	-	SBH	0% (0/79)	
Cruz és mtsai (1997)	Hollandia	OSCC (36) és klinikailag egészséges nyálkahártya (12)	-	PCR (Bam HI W, BNLF1)	100%/ (36/36, BamHI W) 50% (18/36, BNLF1) 8,3% (1/12) nyh. pozitív	
Cruz és mtsai (2000)	Hollandia	OSCC (13)	-	IHC, RT-PCR, NASBA, ISH	100%/ (13/13, BamHI W)	EBNA1, LMP-1, ZEBRA protein (IHC); EBNA1/2, LMP1/2, BHRF1, BARF0 (RT-PCR, NASBA); EBER (RNS ISH)
Godenberg és mtsai (2004)	Észak-Amerika	HNC (300)	-	kvatitatív PCR	25,3% (76/300)	
Gonzalez-Moles (2002)	Spanyolország	OSCC (78)	+ (50)	PCR, IHC, ISH	19,2% (15/78) 0% (0/50) kontroll	LMP1 (IHC) 14/15; EBER (ISH) 0/15
Higa és mtsai (2002)	Japán	OSCC (54)	-	PCR (Bam HIF, EBNA2, LMP1) ISH	72,2% (39/54)	LMP1 C-terminális deléciója
Higa és mtsai (2003)	Japán	OSCC (177)	-	PCR	72% (127/177)	
Horiuchi és mtsai (1995)	Japán	OSCC (36)	-	PCR, ISH, IHC	52,8% (19/36)	LMP1 (IHC) 0% (0/19) EBER1 (ISH) 53% (10/19)
Kobayashi és mtsai (1999)	Japán	OSCC (46)	-	PCR (BamHI W), SBH, IHC, ISH	15,2% (7/46)	EBER1 (ISH) 0/7 LMP1 (IHC) 6/7
Mao és mtsai (1993)	Anglia	OSCC (20, tumorszövet + orális mucosa)	+ (60)	PCR	50% (10/20, orális mucosa), 35% (7/20, tumorszövet), 25% (15/60, kontroll)	
Van Rensburg és mtsai (1995)	Dél-Afrika	OSCC (105)	+ (38)	nested PCR (Bam HI W fragment)	25,7% (27/105)	
Shaama és mtsai (2008)	Egyiptom	OSCC (22)	+ (20)	IHC		LMP1 OSCC 81,8% (18/22) LMP1 kontroll 0% (0/20)

HNC: head and neck cancer, fej-nyaki daganat; IHC: immunhisztokémia; ISH: in situ hybridisation; NASBA: nucleic acid sequence-based amplification; OSCC: oral squamous cell carcinoma, orális laphámsejtes carcinoma; PCR: polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcriptase-PCR; SBH: southern blot hibridisation.

Azért, hogy közelebb kerüljünk az EBV OSCC-ben betöltött szerepéhez, munkacsoportunk elsők közt vizsgálta ezen betegek egészséges szájnyálkahártyájának, valamint orális premalignus elváltozásokban szenvedő betegek léziójának és egészséges mucosájának EBV hordozását. Összességében véve az OSCC betegek tumorszövetében és egészséges nyálkahártyájában is hasonló EBV prevalenciát detektáltunk (73,8% vs. 66,2%). Ha a betegeket kettéosztottuk léziójában EBV pozitív és negatív csoportokra, megállapítottuk, hogy az EBV negatív tumorral rendekező betegek egészséges nyálkahártyájában is szignifikánsan magasabb az EBV hordozás (52,9%) a kontroll csoporthoz (19,1%) képest és hasonló az EBV pozitív tumoros betegek egészséges nyálkahártyájának EBV pozitivitásához (70,8%). Az egészséges orális mucosa vizsgálata során kapott eredményeink azt mutatják, hogy az EBV DNS jelelenléte nem csak a daganatos lézióra, hanem az egészséges nyálkahártyára is jellemző, és sokkal inkább a tumor indukálta immunszuppresszív állapot következménye lehet és a daganatos állapot általános jellemzője. Ezen feltételezésünket erősítik munkacsoportunk egy másik tumorvírus, a humán papillomavírus (HPV) vizsgálata során kapott eredményei. A HPV esetében a tumorukban HPV negatív OSCC betegek klinikailag egészséges nyálkahártyájának vírushordozása (2,9%) hasonló volt a kontroll csoportéhoz (4,2%) és szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a HPV pozitív tumoros betegek egészséges mucosájának vírushordozása (45,2%). Mindezek alapján elmondható, hogy a HPV hordozás a daganatos lézióhoz köthető, ami a HPV OSCC-ben betöltött etiológiai szerepét valószínűsíti (Szarka és mtsai, 2009). Ezzel szemben az EBV esetében az OSCC betegeink körében mind a tumoros, mind pedig az egészséges nyálkahártya mintában – függetlenül a daganat EBV pozitivitásától - magas az EBV DNS előfodulási gyakorisága, ami alapján az vírus etiológiai szerepe kevéssé valószínűsíthető és magas prevalenciája inkább az immunológiai változásokkal magyarázható. A tumorszövetek magas EBV pozitivitása a vírussal fertőzött B-lymphocyták és macrophagok szövetbe való infiltrációjával is magyarázható, továbbá azzal, hogy az immunológiai változások eredményeként a keratinocyták érzékenyebbé válhatnak az EBV fertőzésre, ezért a betegek egészséges nyálkahártyájában is megjelenhet a vírus (Cruz és mtsai, 2000).

A magas EBV hordozás immunológiai okokra visszavezethető magyarázatát támaszthatják alá a különböző rákmegelőző állapotok vizsgálata során kapott EBV prevalencia adatok. Az OLP betegcsoport léziójának közel felében (46,6%) sikerült az EBV genomját detektálni, míg az OL esetén csak 29,5%-ban mutattuk ki a vírus DNS-ét. A kontroll csoporttal összevetve az OLP betegek körében - hasonlóan az OSCC csoportunkhoz - szignifikánsan magasabb volt az EBV pozitívak aránya, míg az OL betegek esetén a

különbség nem volt szignifikáns. Hasonló eredményekről számol be Sand és munkacsoportja, akik OSCC és OLP betegcsoportjukban szintén szignifikánsan magasabb EBV prevalenciát detektáltak a kontroll csoportjukhoz képest. A magas EBV prevalencia oka lehet a betegség során kialakuló lokális vagy általános immunvédelem csökkenés (Sand és mtsai, 2002). A két rákmegelőző állapot közötti különbség a két betegség eltérő pathomechanizmusával magyarázható. Az OLP az szájüreg nyálkahártyájának krónikusan fennálló gyulladása. Pontos eredetét nem ismerjük, azonban úgy tartják, hogy a betegség hátterében a T-sejt mediálta autoimmun hatás állhat, mint kóroki tényező. A folyamatok hátterében különböző citokinek, főként az INF-γ (interferon-gamma) és TNF-α (tumor nekrózis faktor-alfa) fokozott termelése áll, mely végső soron az epithelialis sejtek apoptózisához vezet. A sejtek fokozott apoptózisát a környezetükben lévő aktivált CD8+ sejtek működése váltja ki (Sugerman és Savage, 2002; Ismail és mtsai, 2007). Mindezek alapján kézenfekvő lehet az a feltételezés, miszerint az OLP során fellépő autoimmun folyamatok és a megváltozott citokin profil miatt olyan környezet alakul ki, mely kedvező lehet az EBV reaktivációja és ürülése szempontjából. Mivel az OLP és OSCC kialakulása folyamán immunológiai változások történnek, ez a hasonlóság lehet a magyarázata annak, hogy az OLP és OSCC betegcsoportban is magas EBV pozitivitást mutattunk ki. Ezzel szemben az OL csoportban detektált alacsonyabb EBV prevalencia oka lehet, hogy az OL főként krónikus mechanikai vagy kémiai irrtáció következménye és az EBV reaktivációját és ürülését segítő immunológiai változások nem jellemzőek erre a premalignus lézióra (Neville és Day, 2002; Napier és Speight, 2008).

Az EBV etiológiai szerepét az OSCC patogenezisében azonban nem lehet teljesen kizárni, mivel lehetséges, hogy, hozzájárul a carcinogenesis folymatához a tumoros betegségek egy részében. Viszont a vírus szerepe a tumorképződésben nehezen bizonyítható, mivel az eredményeket nagymértékben befolyásolja többek között az a tény, hogy a legtöbb tanulmány - beleértve a jelenlegit is - kisszámú populációt vizsgál, melynek statisztikai eredményeiből nem vonhatók le pontosabb következtetések.

Fontos megjegyezni, hogy azok a populációk, melyek esetében az EBV kóroki szerepét valószínűsítik az OSCC kialakításában, általában megegyeznek azokkal, ahol az EBV-asszociált nasopharyngealis carcinoma is gyakori (Crawford és mtsai, 2001; Goldenberg és mtsai, 2001; Higa és mtsai, 2002; Higa és mtsai, 2003). Ebből arra következtethetünk, hogy azok a genetikai és/vagy életmódbeli szokásokhoz társítható prediszponáló faktorok, melyek a vírus hatását segítik a nasopharyngealis carcinoma pathogenezisében, hasonlóképpen segíthetik az OSCC kialakulását. Bár a kontroll csoportunkhoz képest szignifikánsan magasabb EBV pozitivitást detektáltunk az orális léziókban, szeretnénk felhívni a figyelmet,

hogy a magas EBV prevalencia nem mindig jelöl valós összefüggést a vírus jelenléte és a betegség kialakulása között. Éppen ezért munkacsoportunk vizsgálta a betegek egészséges szájnyálkahártyájának EBV hordozását is, ami segítheti az adatok helyes értelmezését és az összefüggések feltárását.

A 9-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő INK4A/ARF lókusz által kódolt $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének anomáliáit különböző típusú daganatokban figyelték meg. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének fő inaktiválódási mechanizmusai közé tartozik a deléció és a mutáció, mint strukturális változás; valamint a promóter metiláció, mint epigenetikai változás. Egyes szerzők szerint az OSCC kialakulása folyamán a $p16^{INK4A}$ gén promóterének metilációja viszonylag korai történésnek tekinthető (Ruesga és mtsai, 2007). Ezen tumorszuppresszor géneket érintő genetikai illetve epigenetikai (promóter metiláció) változások gyakorságát sokan vizsgálták fej-nyaki tumorokban is, azonban prevalenciájuk igen eltérő az egyes tanulmányok között. Egy több tanulmányt összefoglaló közleményben a $p14^{ARF}$ gént érintő promóter metiláció gyakorisága 14% és 34% között változik, míg a $p16^{INK4A}$ gén metilációjának prevalenciája 5-68% közé tehető (Demokan és Dalay, 2011). Ezért a fej-nyaki daganatok tekintetében a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének genetikai vagy funkcionális inaktiválódásának fontossága vitatott maradt. Továbbá a legtöbb tanulmány a géneket érintő aberrációk gyakoriságára helyezi a hangsúlyt, illetve nem, vagy csak kisszámú egészséges kontroll populációt vizsgálnak.

Eredményeinket tekintve csupán egyetlen OSCC betegmintában sikerült kimutatnunk $p16^{INK4A}$ gént (exon 1α) érintő deléciót. Az általunk vizsgált LSCC betegcsoportban azonban a deléció fontos inaktiválódási mechanizmus lehet mindkét gén esetében. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének exonjait érintő deléció ugyanis szignifikánsan gyakrabban fordult elő a laryngealis carcinomában szenvedő betegcsoportban, mint a kontroll és az OSCC csoportban. Statisztikai adataink szerint a p16 exonok deléciója befolyásolhatja az LSCC-ben szenvedő betegek túlélését is, bár eredményünk nem mutatott szignifikáns eltérést (p=0,054). Hasonló adatokról számol be egy korábbi tanulmány is. Reed és munkacsoportja invazív, primer fej-nyaki tumorokban vizsgálta a $p16^{INK4A}$ gént érintő változásokat. Az immunhisztokémiai vizsgálattal p16 fehérjére negatívnak bizonyult minták 67%-ában találtak homozigóta deléciót a $p16^{INK4A}$ génben. Fontos megemlíteni, hogy Reed és munkatársai fej-nyaki tumorokat említenek tanulmányukban és a daganatok pontos lokalizációja nem ismert. (Reed és mtsai, 1996). A szakirodalomban nem, vagy csak nehezen fellelhető egy-két olyan tanulmány, mely kifejezetten laryngealis daganatokban vizsgálja a tumorszuppresszor gének delécióit. Swellam és munkatársainak eredményei szerint 68,6%-ban sikerült $p16^{INK4A}$ gén deléciót detektálniuk

140 laryngealis laphámsejtes carcinomában szenvedő beteg tumoros mintájában. Statisztikai elemzésük szerint a $p16^{INK4A}$ deléciót mutató betegeknek szignifikánsan kisebb esélyük van a tumormentes túlélésre, mint a deléciót nem hordozó betegeknek (Swellam és mtsai, 2008). Munkacsoportunk a $p16^{INK4A}$ delécióinak hasonló hatását írta le az LSCC betegek tüntementes túlélésére, bár ez a hatás – feltehetően a jelentősen alacsonyabb esetszám miatt – csak szignifikancia határérték közeli volt (p=0,054).

Bár jelen tanulmányunkban nem sikerült jelentős deléciós gyakoriságot kimutatnunk az OSCC betegcsoportban, több közlemény is fellelhető, melyek relative magas deléciós arányról számolnak be orális laphámsejtes carcinomában szenvedő betegek mintáiban. Sailasree és munkacsoportja 116 orális carcinomában szenvedő beteg mintájában vizsgálta a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének anomáliáit. A betegek 33% és 12%-ában mutattak ki $p16^{INK4A}$ illetve a $p14^{ARF}$ gén delécióját (Sailasree és mtsai, 2008). Japán tanulmányok az általuk vizsgált tumoros minták felében vagy több mint felében mutatták ki a $p16^{INK4A}$ gén valamely exonját érintő homozigóta deléciót, valamint mások, az esetek 25-30%-ában a p14 exonjának delécióját is megfigyelték (Bradley és mtsai, 2001; Nakahara és mtsai, 2001; Shintani és mtsai, 2001). Az OSCC betegcsoportunkat illetően az említett japán és indiai adatok és az általunk közölt magyarországi eredmények közötti különbség a földrajzi eltérésből, a dohányzási és táplálkozási szokások különbségeiből adódhat. Sajnálatos módon az említett tanulmányokban a betegek dohányzási, alkoholfogyasztási és táplálkozási szokásait nem jegyezték fel.

Érdekes módon az egészséges egyénekből származó szájüregi kontroll mintában is mutattunk ki mindkét gént érintő deléciókat. Prognosztikai értelemben ez jelentheti azt, hogy ezeknek az egészséges egyéneknek nagyobb esélyük van a tumor kialakulására. Másrészről, a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ exonok delécióra utaló amplifikációjának a sikertelensége lehet az alkalmazott primerek kötődési helyét érintő, kisebb jelentőségű genetikai változások (polimorfizmus, mutáció, kisebb deléció) következménye. Vizsgálataink során törekedtünk a fals negatív eredmények kizárására azáltal, hogy a PCR vizsgálatokat több ismétlésben végeztük illetve megállapítottuk a PCR érzékenységét. Az exon deléciók amplifikációs technikával történő vizsgálatának másik fontos limitációja, hogy ezzel a módszerrel csak a homozigóta deléciók mutathatóak ki.

Szekvenálási eredményeinket tekintve a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gént érintő mutációk szerepe, úgy tűnik, elenyésző a tumor kialakulásában. Vizsgálataink során csak két mutációt sikerült detektálnunk, melyek csak az OSCC csoportban fordultak elő. Mindkét mutáció a p16 exon 1α-t érintette; az egyik a kódoló, a másik a nem kódoló régióban helyezkedik el. Az

általunk detektált polimorfizmusok megegyeznek a már jól ismert polimorfizmusokkal. Néhány polimorfizmusról leírták, hogy szerepe lehet bizonyos tumorok kialakulásában. Thakur és munkacsoportja méhnyakrákban szenvedő indiai páciensekben írta le a p16 exon 3 3'UTR (untranslated region) régióját érintő polimorfizmust, melynek protektív hatása lehet a tumor kialakulásával szemben (Thakur és mtsai, 2012). A p16 polimorfizmusát melanómás betegekben is detektálták, ahol a polimorfizmust hordozó betegeknek szignifikánsan rövidebb a tumormentes túlélésük (Sauroja és mtsai, 2000).

Jelenlegi vizsgálati csoportjainkban, úgy tűnik, hogy a $p16^{INK4A}$ gént érintő polimorfizmusoknak nincs nagy jelentőségük, mivel minden általunk detektált változás, mely a kódoló régiót érintette, heterozigóta volt. Néhány korábbi tanulmány, hasonlóan a mi adatainkhoz, a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gén alacsony mutációs arányát mutatta ki fej-nyaki tumoros páciensek mintáiból. Nakahara és munkatársainak mindössze három mutációt sikerült azonosítaniuk a 32 orális és maxillofaciális laphámsejtes carcinoma mintáikban, mely mutációk a $p16^{INK4A}$ exon 1α és exon 2-t érintették (Nakahara és mtsai, 2001). Lin és munkacsoportja valamint Ohta és munkacsoportja hasonlóan alacsony mutációs rátáról számolnak be, mely alapján ezeknek a mutációknak nem tulajdonítanak jelentős szerepet a betegség kialakulásában (Lin és mtsai, 2000; Ohta és mtsai, 2009). A $p14^{ARF}$ exon 1β-t és p53-t érintő mutációt mutattak ki fej-nyaki tumoros betegekben. Bár a $p14^{ARF}$ mutáció aránya jóval alacsonyabb volt a p53 mutációjához képest, összességében véve a tumorszuppresszor gének mutációi szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő a rekurrens, mint a primer tumorokban (Weber és mtsai, 2002). Zeng és munkacsoportja a $p16^{INK4A}$ polimorfizmusainak szerepét vizsgálta a laphámsejtes fej-nyaki tumorok etiológiájában. Hasonlóan az előbb említett tanulmányokhoz, homozigóta polimorfizmust csak néhány esetben detektáltak, ezért ők is úgy vélik, hogy a $p16^{INK4A}$ gén polimorfizmusainak szerepe semleges a fej-nyaki tumorokban (Zheng és mtsai, 2002).

Metiláció-specifikus PCR eredményeink alapján a promóterek metilációs állapota a $p16^{INK4A}$ gén esetében egy mérsékelten fontos funkcionális inaktiválódási mechanizmust jelenthet, míg a $p14^{ARF}$ esetében a promóter metilációs státusz kevésbé fontos. Vizsgálataink során több mintában részleges metilációt mutattunk ki, azaz a metilált szignál mellett ugyanabban a mintában megjelent a nem metilált jel is, hasonlóan Shintani és munkatársai illetve Kulkarni és munkatársa által prezentált eredményekhez (Shintani és mtsai, 2001; Kulkarni és Saranath, 2004). Ez nemcsak a promóter régió részleges metiláltságából adódhat, hanem a tumorszövet heterogén szövettani összetételéből is. Előfordulhat ugyanis, hogy a tumor nagy része valóban hipermetilált, azonban a kimetszett tumorban (vagy annak egy

részében) normál szövet is jelen van, mely nem metilált, vagy csak nagyon alacsony metiláltsági szintet mutat (Jaffrain-Rea és mtsai, 1999; Shintani és mtsai, 2001). Figyelembe véve, hogy a metiláció specifikus PCR egy igen érzékeny módszer, a szövetmintába kerülő kis mennyiségű (esetünkben nem metilált) normál szövet metiláltsági fokát is kimutathatja.

A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gén promóter metilációja az epigenetikai változások közé tartozik. Az irodalmi adatok szerint sok tumor típusban mutatták ki ezen promóterek hipermetilációját, úgymint laphámsejtes fej-nyaki carcinomában, nyelőcső vagy tüdő daganatban (Belinsky és mtsai, 1998; Weber és mtsai, 2002; Ohta és mtsai, 2009; Salam és mtsai, 2009). Salam és munkatársai a földrajzi régiókra jellemző és táplálkozási szokásokkal összefüggő promóter metilációt figyeltek meg nyelőcső daganatokban. Vizsgált betegcsoportjuk Indiának egy olyan területéről származott, ahol a nyelőcső daganatok 5-6-szor gyakrabban fordulnak elő, mint India más területein. A genetikai és epigenetikai változásokon kívül a rákos megbetegedések egyik okának a környezeti ártalmakat és az étkezési szokásokat tartják. Véleményük szerint ezen a területen élő emberek által fogyasztott forró teában fellelhető karcinogén anyag hozzájárulhat a különböző genetikai és epigenetikai változások kialakulásához (Salam és mtsai, 2009). Hall és munkacsoportjának tanulmányában a $p16^{INK4A}$ promóter hipermetilációja gyakrabban fordult elő azokban az orális epithelialis dysplasiákban, ahol a malignus transzformáció esélye nagyobb volt. Ezek alapján a $p16^{INK4A}$ promóter metilációja ígéretes biomarkernek tűnik a dysplasia malignus transzformációjának predikciója szempontjából (Hall és mtsai, 2008). Jelen tanulmányunkban a $p16^{INK4A}$ metilációja szignifikánsan gyakrabban fordult elő OSCC-ben és LSCC-ben, mint az egészséges csoportban. A statisztikai eredményeink pedig azt mutatták, hogy a $p16^{INK4A}$ metilációja kedvezőtlenül befolyásolhatja az OSCC-ben szenvedő betegek tumormentes túlélését, bár az eltérés nem volt szignifikáns ($p=0,108$). Vizsgálataink során a $p14^{ARF}$ metilációját is detektáltuk, azonban statisztikai különbséget csak az OSCC betegcsoport esetében mutattunk ki.

Eredményeink és a szakirodalomban fellelhető adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a tumorszuppresszor gén promóterek kritikus CpG szigeteinek metilációja mérsékelten fontos vagy fontos inaktiválódási mechanizmus lehet a fej-nyaki tumorok és egyéb tumorok kialakulásában. A $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének hipermetilált promótere mindig inaktívnak tekinthető (Kondo és mtsai, 2003).

Ha azonban a tumorszuppresszor gének promóterei részlegesen metilált vagy nem metilált állapotban vannak jelen a sejtekben, egyéb epigenetikai változások is szerepet kaphatnak a génexpresszió szabályozásában. A promóter metiláláson kívül az epigenetikai

változásokhoz tartoznak a különböző hiszton modifikációk is, melyek lehetnek például a hiszton fehérjék lizin aminosav oldalláncainak acetilációja vagy metilációja. A hiszton fehérjék szerepe a kromatin struktúrájának kontrollja, ezáltal a génexpresszió szabályozása. A hiszton fehérjék metilációja vagy acetilációja szintén befolyásolja a génexpressziót, abban az esetben is, ha a promóterek CpG szigetei nem metiláltak, azaz transzkripciósan aktív állapotban vannak (Kondo és mtsai, 2003). A promóter metiláció és a hiszton modifikáció mellett a kis, szabályozó RNS-eknek is szerepe van a génexpressziós szabályozó folyamatokban. Ezek a mikroRNS-ek közvetlen transzkripcionális szabályozással vagy a transzkripciós faktorok transzlációjának szabályozásával, az mRNS-ek degradációjával gátló szerepet töltenek be a szabályozási folyamatokban (Suzuki és mtsai, 2013).

Adataink a tumorgenezis során bekövetkező fontos genetikai események sokféleségére hívják fel a figyelmet, valamint arra, hogy a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor géneket érintő promóter metiláció gyakorisága eltérő lehet a különböző fej-nyaki dagantok esetén. Az exon mutációk nem jelentősek, így nem tekinthetők fontos genetikai eseménynek orális és laryngealis laphámsejtes tumorok esetén sem. Úgy tűnik, hogy OSCC-ben a promóter metiláció (különösen a $p16^{INK4A}$ gént érintő) tekinhető az általunk vizsgált genetikai és epigenetikai eltérések közül a leggyakoribbnak; LSCC-ben pedig a gének promóter metilációja valamint az exonok delécója játszhat szerepet a gén inaktiválódásban. A kontroll populációban a gének genetikai változásait kisebb arányban mutattuk ki. Bár a genetikai változások túlélsre gyakorolt hatásának staisztikai adatai nem mutatnak szignifikáns eltérést, de közel vannak a szignifikancia határértékhez. Hatásuk pontosabb megítéléséhez és szignifikáns adatok detektálásához egy nagyobb számú populáció vizsgálata szükséges.

Konklúziók:

- Elsők közt vizsgáltuk OSCC betegek körében a tumorszövet vírushordozásával párhuzamosan a betegek egészséges szájnyálkahártyájának EBV pozitivitását. A vizsgált OSCC betegcsoport tumoros és egészséges nyálkahártyáról származó mintájában is szignifikánsan magasabb volt az EBV előfordulása, mint a két premalignus elváltozásban (OL, OLP) szenvedő betegcsoportban illetve a kontroll populációban.
- Az EBV negatív tumorral rendelkező betegek egészséges nyálkahártyájában is szignifikánsan magas vírushordozást mutattunk ki a kontollhoz képest és ez az arány,

hasonló volt az EBV pozitív tumoros betegek egészséges nyálkahártyájának EBV pozitivitásához.

- Elsők közt vizsgáltuk az orális premalignus elváltozásokban szenvedő betegek léziójának és egészséges mucosájának EBV hordozását is. Az OLP betegek léziójában szinifikánsan nagyobb volt az EBV pozitivitás, mint az OL és kontroll csoportban.
- Az EBV szerepe, mint etiológiai faktor az OSCC kialakításában, adataink alapján nem bizonyítható egyértelműen. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az EBV jelenléte a betegeknek mind a tumoros, mind pedig az egészséges nyálkahártyájára jellemző, mely a betegség folyamán kialakult immunszupprimált állapot következménye lehet.
- Az OSCC-ben szenvedő betegek körében a tumor magasabb T stádiuma szignifikánsan rontotta a tünetmentes túlélés esélyét. A daganat kedvezőtlen lokalizációja valamint a tumor magasabb T stádiuma csökkentette a tünetmentes túlélést az EBV pozitív OSCC betegcsoportban.
- Elsőként vizsgáltuk egészséges egyének körében a tumorképződés szempontjából fontos $p14^{ARF}$ és a $p16^{INK4A}$ gének genetikai és epigenetikai eltéréseit.
- A fej-nyaki tumorok tekintetében az LSCC betegcsoportban, $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor géneket érintő deléció fontos inaktiválódási mechanizmus lehet, mivel szignifikánsan magasabb arányban fordult elő, mint OSCC-ben és az egészséges kontroll populációban.
- A $p16^{INK4A}$ gén esetében az általunk detektált, kódoló régiót érintő mutációk és polimorfizmusok heterozigóták voltak, ezért ezeknek a változásoknak nincs, vagy csak elenyésző szerepe lehet a tumor kialakulása szempontjából.
- A $p16^{INK4A}$ gén promóterét érintő metiláció szignifikánsan gyakoribb volt OSCC-ben és LSCC-ben is, mint a kontroll egyénekben. Jelen vizsgálati csoprtunkban a $p16^{INK4A}$ gén promóterének metiláltsági állapota mérsékelten fontos, míg a $p14^{ARF}$ gén promóter metilációja kevésbé jelentős inaktiválódási mechanizmus.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fej-nyaki rosszindulatú daganatok morbiditását és mortalitását tekintve Magyarország az első helyen áll Európában. Aggasztó az a tény is, miszerint az elmúlt 35-40 évben a fej-nyaki tumorok okozta halálozás közel ötszörösére emelkedett hazánkban. A diagnosztika és a terápiás lehetőségek fejlődése ellenére a szájüregi daganatok prognózisa kedvezőtlen. A tumorok kialakulásának hátterében álló különböző környezeti illetve celluláris folyamatok ismerete még ma sem tisztázott pontosan. A magyarországi populációt illetően az orális daganatok és premalignus elváltozások EBV prevelenciájáról illetve a fej-nyaki daganatok esetén a $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ gének változásairól szóló irodalmi adatok tudomásunk szerint nem állnak rendelkezésre.

Több munkacsoport feltételezi, hogy az EBV hozzájárul az OSCC kialakulásához és/vagy progressziójához, ugyanakkor valószínűsíthető, hogy ez a szerep földrajzi régiónként, populációként és tumortípusonként változik. Jelen tanulmányunkban meghatároztuk az EBV előfordulási gyakoriságát szájüregi laphámsejtes carcinomában, két premalignus elváltozásban (OL és OLP) illetve egészséges kontroll mintákban. Hogy a vírus pontosabb etiológiai szerepét meghatározzuk mindegyik betegcsoportnak megvizsgáltuk az egészséges nyálkahártyájáról származó exfoliált sejtejeit is. Pusztán a léziók EBV hordozását vizsgálva, eredményeink szerint az OSCC-ben és OLP-ben szenvedő betegek léziójában gyakori az EBV jelentléte, mely alapján valószínűsíthető a vírus szerepe a tumor kialakulásában. Megvizsgálva azonban a betegek egészséges nyálkahártyáját azt tapasztaltuk, hogy az EBV pozitivitásuk hasonló a léziókban tapasztaltakhoz. Ezért a vírus jelenléte nem magára a lézióra/tumoros környezetre jellemző, hanem inkább a beteg általános állapotával hozható összefüggésbe. A daganatos betegség következtében megváltozott immunológiai folyamatok aktiválhatják a B-lymfocytákat melyek által a vírus megjelenhet a magában a lézióban, a környező szövetekben és a nyálban.

Munkánk második felében a tumorgenezis szempontjából fontos $p14^{ARF}$ és $p16^{INK4A}$ tumorszuppresszor gének aberrációit vizsgáltuk fej-nyaki daganatokban. Eredményeink alapján az általunk vizsgált, fej-nyaki tumoros magyarországi populációban a géneket érintő mutációk és polimorfizmusok nem jelentősek. Az LSCC csoportunkban az exonokat érintő deléció viszont fontos inaktiválódási mechanizmus, mely a statisztikai eredményeinket tekintve, nagyobb létszámú populáció esetén kedvezőtlenül befolyásolhatja a tumormentes túlélést. MSP vizsgálataink azt mutatták, hogy a $p16^{INK4A}$ gént érintő promóter metiláció

gyakrabban fordult elő az OSCC és LSCC csoportban a kontroll csoporthoz képest. Ellentétben több tanulmánnyal mégis kisebb arányban mutattunk ki promóter metilációt. A $p16^{INK4A}$ gént érintő promóter metiláció esetünkben egy mérsékelten fontos inaktiválódási mechanizmust jelenthet, míg a $p14^{ARF}$ metilációja kevésbé fontos a fej-nyaki daganatokban. A carcinogenesis során végbemenő, tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és epigenetikai változások tumortípusonként, földrajzi régiónként és ebből kifolyólag táplálkozási, dohányzási és kulturális szokásonként valamint a populációt ért környezeti ártalmaktól függően eltérőek lehetnek.

7. SUMMARY

In Europe, Hungary ranks first both the morbidity and mortality lists regarding head and neck cancer. In Hungary, the mortality due to head and neck tumours increased nearly five-fold in the past 35-40 years. Despite the development of diagnostic and therapeutic options, the prognosis of oral cancers is unfavourable. Moreover, the various environmental and cellular processes underlying in the background of the development of tumours are unknown exactly. According to our knowledge, published information on the EBV prevalence of oral tumours and premalignant lesions as well as the aberrations of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4A}$ genes in head and neck cancers are not available in the Hungarian population.

Studies suggest that EBV contributes to the development and/or progression of OSCC. However, it is probable, that the role of EBV is changed by geographical region, population and tumour type. In our study, we examined the presence of EBV in oral squamous cell carcinoma, premalignant lesions (OL, OLP) and healthy individuals as a control group. In order to determine the more accurate aetiological role of the virus, exfoliated cell samples from apparently healthy mucosa were also examined in case of all patients. Examining only the EBV positivity of the lesions, in our data, patients suffering fom OSCC and OLP carried more EBV DNA in their samples than controls. Based on these results, the role of the virus is possible in the development of tumour. However, when we examined the apparently healthy mucosa of the OSCC patients and it was found, that the tumour tissue and apparently healthy mucosa showed comparable EBV prevalence rate. This data suggests that the EBV prevalence is not associated with the lesions itself, but rather with the general immunological status of the patients. The altered immunological process as the consequence of the malignancy may activate the B-lymphocytes and the high virus presence in tumour tissue, surrounding tissue and the saliva attributed to the B-lymphocytes infiltration.

In our further study, the frequencies of the genetic and epigenetic alterations of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4A}$ tumour suppressor genes were examined in patients with head and neck cancer (OSCC and LSCC). According to our presented data, $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4A}$ tumour suppressor gene mutations and polymorphisms seem to be infrequent and consequently unimportant events in Hungarian population with head and neck cancer. However, the exon deletions may be important inactivation mechanism for both genes in LSCC. Regarding our statistical results, exon deletions in case of larger LSCC population may lead to poorer tumour free survival. Examination of the methylation status of the tumour suppressor promoters, more

frequent methylation of the $p16^{INK4A}$ promoter was found both in OSCC and in LSCC group than in healthy individuals. Nevertheless, althogether we detected lower promoter methylation rate in contrast to other studies. Our data suggest, that in head and neck cancer, methylation status affecting the $p16^{INK4A}$ promoter seems to be a moderate important inactivation mechanism, while less important in case of $p14^{ARF}$. Genetic and epigenetic alterations of tumour suppressor genes during carcinogenesis may vary according to the tumour types, geographical regions and therefore dietary, smoking and cultural habits as well as depends on the population suffering from different environmental damage.

8. IRODALOMJEGYZÉK

8.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Al-Kaabi A, van Bockel LW, Pothen AJ, Willems SM. P16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. Dis Markers. 2014;260549.
2. Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: A role for HPV. Oral Oncol. 2009;45:486-91.
3. Atula S, Auvinen E, Grenman R, Syrjanen S. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in epithelial carcinomas of the head and neck region. Anticancer Res. 1997;17:4427-33.
4. Bagan JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Díaz JM, Gavaldá C, Margaix M, Scully C, Alberola TM, Torres PM, Pérez AM. Epstein-Barr Virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13:E110-3.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. In: World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press. 2005;177-9.
6. Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacrétaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15(INK4b) and p16(INK4a) (MZS) in B-cell and T-cell lymphomas. Blood. 1999;94:1773-81.
7. Batsakis JG. Clinical pathology of oral cancer. In: Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG. Oral cancer. 1st ed, UK, Thieme (Taylor &Francis group) 2003:85-93.
8. Bánóczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. J Maxillofac Surg. 1977;5:69-75.
9. Bánóczy J, Gintner Z, Dombi Cs. Tobacco use and oral leukoplakia. J Dent Educ. 2001;65:322-7.
10. Belinsky SA, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Herman JG. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:11891-6.
11. Berggren P, Kumar R, Sakano S, Hemminki L, Wada T, Steineck G, Adolfsson J, Larsson P, Norming U, Wijkström H, Hemminki K. Detecting homozygous deletions in the CDKN2A (p16(INK4a))/ARF (p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real-time quantitative PCR. Clin Cancer Res. 2003;9:235-42.
12. Bornkamm GW, Hammerschmidt W. Molecular virology of Epstein-Barr virus. Philos Trans R Soc Lond Biol Sci. 2001;356:437-59.
13. Bradley G, Irish J, MacMillan C, Mancer K, Witterick I, Hartwick W, Gullane P, Kamel-Reid S, Benchimol S. Abnormalities of the ARF-p53 pathway in oral squamous cell carcinoma. Oncogene. 2001;20:654-8.

14. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, Burgdorf W. Premalignant epithelial tumors. In: Dermatology. 2000;55:1449-62. Springer, c2000, Berlin, New York.

15. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. Br J Surg. 1958;45:218-3.

16. Chen TC, Hsieh LL, Kuo TT, Ng KF, Wu Chou YH, Jeng LB, Chen MF. P16INK4 gene mutation and alllic loss of chromosome 9p21-22 in Taiwanese hepatocellular carcinoma. Anticancer Res. 2000;20:1621-6.

17. Chen PC, Pan CC, Kuo C, Lin CP. Risk of nonmalignant lesions associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiologic study. Arch Pathol Lab Med. 2006;130:57-61.

18. Chen YJ, Chang J, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chin CC, Lu YC, Li HF, Cheng AJ. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. Cancer Sci. 2008;99:1507-14.

19. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med. 2000;343:481-92.

20. Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001;356:461-73.

21. Cruz I, Van den Brule AJ, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, Snow GB, Van der Waal I. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa – a study using the polymerase chain reaction. Oral Oncol. 1997;22:182-8.

22. Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, Meijer CJ. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. Int J Cancer. 2000;86:356-61.

23. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol. 2009;21:194-200.

24. Csejtei A, Tibold A, Koltai K, Varga Z, Szanyi I, Gobel G, Prantner I, Steffler D, Feher G, De Blasio A, Ember I, Kiss I. Association between XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer in a Hungarian population. Anticancer Res. 2009;29:4169-73.

25. Dany A, Kurian K, Shamugam S. Association of Candida in different stages of oral leukoplaia. J Ind Acad Oral Med Radiol. 2011;23:14-6.

26. Demokan S, Dalay N. Role of DNA methylation in head and neck cancer. Clin Epigenet. 2011;2:123-50.

27. Döbrőssy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. Cancer Metastasis Rev. 2005;24:9-17.

28. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. Am Fam Physician. 2004;70:1279-87.

29. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt' lymphoma. lancet. 1964;1:702-3.

30. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) in independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. Cancer Res. 2000;60:129-33.

31. Faridi R, Zahara A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. Virol J. 2011;8:269.

32. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer. 2010;46:765-81.

33. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. Prospective investigation of the cigarette smoking-head and neck cancer association by sex. Cancer. 2007;110:1593-601.

34. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. Oncogene. 2006;25:5220-7.

35. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for research on Cancer, WHO, http://globocan.iarc.fr

36. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, Sidransky D, Califano JA. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. Laryngoscope. 2004;114:1027-31.

37. Goldenberg D, Golz A, Netzer A, Rosenblatt E, Rachmiel A, Goldenberg RF, Joachims HZ. Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck. Am J Otolaryngol. 2001;22:197-205.

38. Gonzalez-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. Laryngoscope. 2002;112:482-7.

39. Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. Oral Dis. 2008;14:229-43.

40. González X, Correnti M, Rivera H, Perrone M. Epstein-Barr virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV+ Venezuelan patients. Med oral patol Oral Cir Bucal. 2010;15:e297-302.

41. Hall GL, Shaw RJ, Field EA, Rogers SN, Sutton DN, Woolgar JA, Lowe D, Liloglou T, Field JK, Risk JM. P16 promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:2174-9.

42. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, Andersson G. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: A population-based case-control study in southern Sweden. Acta Otolaryngol. 2005;125:1337-44.

43. Herman JG, Graff JR, Myöhanen S, NelkinBD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:9821-6.

44. Hernádi K, Szalmás A, Mogyorósi R, Czompa L, Veress G, Csoma E, Márton I, Kónya J. Prevalence and activity of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis lesions. J Endod. 2010;36:1485-9.

45. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. J Ciln Pathol. 2002;55:414-23.

46. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, Iwamasa T, Arasaki A, Sunakawa H. Epstein-Barr virus (EBV)-related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in southern Japan--simultaneously infected with human papillomavirus (HPV). Oral Oncol. 2003;39:405-14.

47. Hippocrate A, Ousaief L, Joab I. Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers. Cancer Lett. 2011;305:144-9.

48. Horiuchi K, Mishima K, Ichijima K, Sugimura M, Ishida T, Kirita T. Epstein-Barr virus in the proloferative diseases of squamous epithelium in the oral cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995;79:57-63.

49. Hsu JL, Glaser SL. Epstein-Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. Crit Rev Oncol Hematol. 2000;34:27-53.

50. Inman GJ, Farrell PJ. Epstein-Barr virus EBNA-LP and transcription regulation properties of pRB, p107 and p53 in transfection assays. J Gen Virol. 1995;76:2141-9.

51. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. J Oral Sci. 2007;49:89-106.

52. Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. J Neurooncol. 2001;51:219-29.

53. Jaffrain-Rea ML, Ferretti E, Toniato E, Cannita K, Santoro A, Di Stefano D, Ricevuto E, Maroder M, Tamburrano G, Cantore G, Gulino A, Martinotti S. P16 (INK4a, MTS-1) gene polymorphism and methylation status in human pituitary tumours. Clin Endocrinol (Oxf). 1999;51:317-25.

54. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CS Cancer J Clin. 2011;61:69-90.

55. Jiang P, Yue Y. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis. Exp Ther Med. 2014;7:3-7.

56. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. Periodontol 2000. 2011;57:19-37.

57. Kieff E, Rickinson AB. Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe DM, Howley PN eds. Fields Virology, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:2511-73.

58. Kim BN, Yamamoto H, Ikeda K, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Fujie Y, Ogawa M, Hata T, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Matsuura N, Monden M. Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. Int J Oncol. 2005;26:1217-26.

59. Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. Nagoya J med Sci. 2013;75:169-79.

60. Knight JS, Sharma N, Robertson ES. Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:18562-6.

61. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, Ohishi M, Sakai H. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. J Pathol. 1999;189:34-9.

62. Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. Mol Cell Biol. 2003;23:206-15.

63. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. Oral Oncol. 2004;145-53.

64. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, Bertuccio P, Negri E, Boyle P, Levi F. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. Ann Oncol. 2010;21:1323-60.

65. Lin SC, Chang KW, Chang CS, Liu TY, Tzeng YS, Yang FS, Wong YK. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. J Oral Pathol Med. 2000;29:159-66.

66. Macleod K. Tumor suppressor genes. Curr Opin Genet Dev. 2000;10:81-93.

67. Mandell GL, Benett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Benett's Principles and practice of infectious diseases. In: Johannsen EC, Kenneth MK. Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus-associated malignant diseases and other diseases) 7th ed, Philadelphia, 2010:1989-2005.

68. Mao EJ, Smith CJ. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 1993;22:12-7.

69. Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. Cancer Cell. 2004;5:311-6.

70. Michelow P, Wright C, Pantanowitz L. A review of the cytomorphology of Epstein-Barr virus-associated malignancies. Acta Cytol. 2012;56:1-14.

71. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. Oral Dis. 2007;13:126-33.

72. Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, Kónya J, Oláh E, Rák K, Tóth FD. Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. Eur J Cancer. 2003;39:2298-305.

73. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16 (INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. Cancer Lett. 2001;163:221-8.

74. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. J Oral Pathol Med. 2008;37:1-10.

75. Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss Cs, Márton IJ. Oral cancer report from northeastern Hungary. Pathol Oncol Res. 2008;14:85-92.

76. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin. 2002;52:195-215.

77. Nola-Fuchs P, Boras VV, Plecko V, Plestina S, Milenović A, Susić M, Brailo V. The prevalence of human papillomavirus 16 and Epstein-Barr virus in patients with oral squamous cell carcinoma. Acta Clin Croat. 2012;51:609-14.

78. Nurse P. Ordering S phase and M Phase in the cell cycle. Cell. 1994;79:547-50.

79. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. Clin Microbiol Rev. 2011;24:193-209.

80. Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, Sanij E, Hertzog P, Wolvetang E, Ghysdael J, Rowe M, Hara E. Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. J Cell Biol. 2003;162:173-83.

81. Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, Miyamoto H, Yazawa T, Danenberg K, Danenberg PV, Tohnai I, Kubota Y. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107:81-91.

82. Ottó Sz. Cancer epidemiology in Hungary and the Béla Johan Nationoal Program for the decade of health. pathol Oncol Res. 2003;9:126-30.

83. Páldy A, Nádor G, Vincze I, Bakacs M, Rajcsányi Á, Pintér A. Az ajak, szájüreg és garat rosszindulatú daganatos betegsége miatti halálozás valamint a morbiditás területi különbségei Magyarországon. Magy Onkol. 2001;45:106-14.

84. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.

85. Petti S, Scully C. Association between different alcoholic beverages and leukoplakia among non- to moderate-drinking adults: a matched case-control study. Eur J Cancer. 2006;42:521-7.

86. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Aby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 1996;56:3630-3.

87. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta. 1998;1378:F115-77.

88. Ruesga MT, Acha-Sagredo A, Rodríguez MJ, Aguirregaviria JI, Videgain J, Rodríguez C, de Pancorbo ML, Aguirre JM. P16 (INK4A) promoter hypermethylation in oral scrapings of oral squamous cell carcinoma risk patients. Cancer Lett. 2007;250:140-5.

89. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. Curr Opin Cell Biol. 2001;13:332-7.

90. Saha A, Murakami M, Kumar P, Bajaj B, Sims K, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. J Virol. 2009;83:4652-69.

91. Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:414-20.

92. Salam I, Hussain S, Mir MM, Dar NA, Abdullah S, Siddigi MA, Lone RA, Zargar SA, Sharma S, Hedau S, Basir SF, Bharti AC, Das BC. Aberrant promoter methylation and reduced expression of p16 gene in esophageal squamous cell carcinoma from Kashmir valley: a high-risk area. Mol Cell Biochem. 2009;332:51-8.

93. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93:586-92.

94. Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R, Talve L, Hahka-Kemppinen M, Punnonen K, Jansén CT, Hemminki K, Pyrhönen S. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. Genes Chromosomes Cancer. 2000;28:404-14.

95. Ščėsnaitė A, Gudlevičienė Ž, Jarmalaitė S. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes in tumour cells from patients with head and neck cancer. Biologija. 2008;54:161-6.

96. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with special analysis for tongue cancer. Arch Otolaryngol Head neck Surg. 2002;128:268-74.

97. Shamaa AA, Zyada MM, Wagner M, Awad SS, Osman MM, Abdel Azeem AA. The significance of Epstein-Barr virus (EBV) & DNA topoisomerase II alpha (DNA-Topo II alpha) immunoreactivity in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia (OED) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). Diagn Pathol. 2008;3:45.

98. Sharpless NE, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. Oncogene. 2003;22:3092-98.

99. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. Curr Opin Genet Dev. 2000;10:94-9.

100. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 2004;18:2699-711.

101. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. Hum Pathol. 2002;33:608-14.

102. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol. 2001;37:498-504.

103. Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. Cancer. 1984;53:563-8.

104. Silverman S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. J Am Dent Assoc. 2001;132:7S-11S.

105. Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. J Periodontal Res. 2006;41:235-44.

106. Smigiel R, Sasiadek M, Krecicki T, Ramsey D, Jagielski J, Blin N. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. Mol Carcinog. 2004;39:147-54

107. Sugerman PB, Savage NW. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. Aust Dent J. 2002;47:290-7.

108. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. Front Genet. 2013;4:258.

109. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. J Clin Virol. 2005;32S:S59-S66.

110. Swellam M, El-Arab LR, Adly A. Prognostic value of cell-cycle regulators and cellular biomarkers in laryngeal squamous cell carcinoma. Clin Biochem. 2008;41:1059-66.

111. Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, Tóth ED, Boda R, Márton I, Gergely L. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. Oral Microbiol Immunol. 2009;24:314-8.

112. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:5455-9.

113. Thakur N, Hussain S, Nasare V, Das BC, Basir SF, Bharadwaj M. Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. Mol Biol Rep. 2012;39:407-14.

114. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. Clin Cancer Res. 2004;10:803-21.

115. Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. Rev Med Virol. 2005;15:3-15.

116. Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Van Heerden W, Raubenheimer E, Schoub BD. Detection of EBV DNA in oral squamous cell carcinomas in a black African population sample. In Vivo. 1995;9:199-202.

117. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. Oral Oncol. 2005;41:244-60.

118. Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. Virchows Arch. 2002;441:133-42.

119. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Shete S, Spitz MR, Wei Q. Haplotypes of two variants in p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11:640-5.

8.2. Saját közlemények jegyzéke

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK

DEENK
www.lib.unideb.hu

Iktatószám: DEENKÉTK/181/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Kis Andrea
Neptun kód: VK5VZ8
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10036864

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kis, A.**, Tatár, T.Z., Gáll, T., Boda, R., Tar, I., Major, T., Redl, P., Gergely, L., Szarka, K.: Frequency of Genetic and Epigenetic Alterations of p14ARF and p16INK4A in Head and Neck Cancer in a Hungarian Population.
Pathol. Oncol. Res. Epub ahead of print (2014)
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s12253-014-9775-9
IF:1.806 (2013)

2. **Kis, A.**, Fehér, E., Gáll, T., Tar, I., Boda, R., D. Tóth, E., Méhes, G., Gergely, L., Szarka, K.: Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population.
Eur. J. Oral. Sci. 117 (5), 536-540, 2009.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00660.x
IF:1.956

DEBRECENI EGYETEM KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. ¤ Tel.: (52) 518–600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu ¤ Honlap: lib.unideb.hu

További Közlemények

3. Gáll, T., **Kis, A.**, Tatár, T.Z., Kardos, G., Gergely, L., Szarka, K.: Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatoses associated with human papillomavirus type 11.
Med. Microbiol. Immunol. 202 (5), 353-363, 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00430-013-0297-y
IF:2.433

4. Fehér, E., Kardos, G., Gáll, T., **Kis, A.**, Gergely, L., Szarka, K.: Comparison of diversity of torque teno virus 1 in different mucosal tissues and disorders.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 (4), 319-337, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.4.8
IF:0.787

5. Gáll, T., **Kis, A.**, Fehér, E., Gergely, L., Szarka, K.: Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: Complete genome comparison of sequential isolates.
Antiviral Res. 92 (2), 356-358, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.007
IF:4.301

6. Beck, Z., Balogh, A., **Kis, A.**, Izsépi, E., Cervenak, L., László, G., Bíró, A., Liliom, K., Mocsár, G., Vámosi, G., Füst, G., Matkó, J.: New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production.
J. Lipid. Res. 51 (2), 286-296, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M000372
IF:6.115

7. Fehér, E., Gáll, T., Murvai, M., **Kis, A.**, Boda, R., Sápy, T., Tar, I., Gergely, L., Szarka, K.: Investigation of the occurrence of torque tenovirus in malignant and potentially malignant disorders associated with human papillomavirus.
J. Med. Virol. 81 (11), 1975-1981, 2009.
DOI: http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21627
IF:2.47

DEBRECENI EGYETEM KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA EGYETEMI ÉS NEMZETI

8. Szarka, K., Tar, I., Fehér, E., Gáll, T., **Kis, A.**, D. Tóth, E., Boda, R., Márton, I., Gergely, L.: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential.
Oral Microbiol. Immunol. 24 (4), 314-318, 2009.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00516.x
IF:2.336

9. Beck, Z., **Kis, A.**, Berényi, E., Kovács, P., Fésüs, L., Aradi, J.: 4-Thio-uridylate (UD29) interferes with the function of protein-SH and inhibits HIV replication in vitro.
Pharmacol Rep. 61 (2), 343-347, 2009.
IF:2.086

10. Beck Z., Illés Á., Keresztes K., Bessenyei B., Szöllősi Z., **Kis A.**, Oláh É.: Az Epstein-Barr vírus ZEBRA fehérjéjének expressziója magyarországi Hodgkin lymphomás betegekben: Látens vagy lítikus ciklus?
Orv. Hetil. 147 (33), 1539-1544, 2006.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,29
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,762

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.09.04

9. TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelven:

orális leukoplakia, orális lichen planus, orális laphámsejtes carcinoma, laryngealis laphámsejtes carcinoma, Epstein-Barr vírus, tumorszuppresszor gén, genetikai változások, promóter metiláció

Angol nyelven:

oral leukoplakia, oral lichen planus, oral squamous cell carcinoma, laryngeal squamous cell carcinoma, Epstein-Barr virus, tumor suppressor gene, genetic alterations, promoter methylation

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Szarka Krisztina egyetemi adjunktusnak, hogy kiváló szakmai vezetése alatt végezhettem el tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá dr. Kónya József egyetemi docensnek és Gergely Lajos professzor úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet jelenlegi és korábbi vezetőinek, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való kutatómunkát.

Szeretném megköszönni a minták gyűjtését és a klinikai adatok szolgátatását a Fogorvostudományi Kar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti valamint a Parodontológiai Tanszék és a Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika munkatársainak.

Köszönöm jelenlegi és volt kollégáimnak, dr. Kardos Gábornak, Tatár Tímea Zsófiának, Gáll Tamásnak, Fehér Enikőnek és az Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi dolgozójának az önzetlen segítségét.

11. FÜGGELÉK

11.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye