

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az Epstein-Barr vírus prevalenciája orális laphámsejtes carcinomában és  
rákmegelőző állapotokban, valamint a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup>  
tumorszuppresszor gének genetikai és epigenetikai változásainak vizsgálata  
fej-nyaki tumorokban**

Kis Andrea

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

**AZ EPSTEIN-BARR VÍRUS PREVALENCIÁJA ORÁLIS LAPHÁMSEJTES  
CARCINOMÁBAN ÉS RÁKMEGELŐZŐ ÁLLAPOTOKBAN, VALAMINT A  
P14ARF ÉS P16INK4A TUMORSSZUPPRESSZOR GÉNEK GENETIKAI ÉS  
EPIGENETIKAI VÁLTOZÁSAINAK VIZSGÁLATA FEJ-NYAKI TUMOROKBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: **Kis Andrea**  
okleveles biológus (mikrobiológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája  
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Bányai Krisztián, PhD  
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2014. november 4. 11 óra, Debreceni Egyetem ÁOK, Infektológiai és Gyermekeimmunológiai  
Tanszék, PR szoba

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora  
Dr. Bay Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora  
Dr. Bay Péter, PhD  
Dr. Bányai Krisztián, PhD  
Dr. Mádi András, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2014. november 4. 13 óra, Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének  
tanterme

## 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. A szájüregi tumorok mortalitásában mindkét nem esetén az első helyen, míg a laryngealis daganatokat tekintve a nők körében a második, férfiak körében a negyedik helyen áll hazánk Európában. 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.

A DNS tumorvírusok közül az Epstein-Barr vírus (EBV) fertőzés 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. Az EBV gyakorisága és etiológiai szerepe is földrajzi régióként nagy változatosságot mutat. Jelen tanulmányunkban, kelet-magyarországi populáció orális laphámsejtes és premalignus elváltozásaiban (orális leukoplakia, OL; orális lichen planus OLP) 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<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor gének. Ezen gének inaktivációjához vezető változásokat számos malignus kórképben vizsgálták. Munkánk második felében célul tűztük ki, hogy a kelet-magyarországi régióból származó fej-nyaki daganatos betegekben megvizsgáljuk a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és promóter metilációs változások gyakoriságát.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### *A fej-nyaki régió rosszindulatú daganatai*

A fej-nyaki tumorok a rosszindulatú daganatok heterogén csoportját alkotják, melyek világszerte komoly egészségügyi problémát jelentenek. Gyakoriságukat tekintve a fej-nyaki daganatok a hatodik leggyakoribb daganattípust képviselik a világon, évente mintegy 500 000 új megbetegedéssel és körülbelül 350 000 halálessel, előfordulási gyakorisága azonban a világ egyes tájain jelentős eltérést mutat. A fej-nyaki daganatok legnagyobb csoportját a szájüregi rákok képezik, míg a második leggyakoribb daganat a laryngealis carcinoma. Epidemiológiai felmérések szerint Magyarország európai viszonylatban vezető helyen áll a fej-nyaki carcinomák incidenciáját és mortalitását tekintve. Egyes közlések szerint Magyarországon 1975 és 2007 között eltelt időszakban a fej-nyaki tumorok miatti halálozás közel ötszörösére emelkedett. 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%.

A szájüregi rosszindulatú daganatok etiológiája igen összetett. Az orális (OSCC) és laryngealis laphámsejtes carcinoma (LSCC) legfőbb kóroki tényezője a dohányzás és az alkoholfogyasztás. A daganat kialakulásában azonban további faktoroknak is lehet szerepe, úgymint a táplálkozási szokások, egyéb élvezeti cikkek (bételrágás) használata, genetikai fogékonyság, rossz fogazati állapot vagy a gombás (Candida) fertőzés. Az onkogén vírusok közül a humán papillomavírus (HPV) vagy az Epstein-Barr vírus (EBV) jelenléte segítheti a tumor kialakulását. Ezeknek a vírusoknak az etiológiai szerepe a tumorok kialakulásában azonban még vitatott. A daganatok kialakulásában azonban a külső tényezőkön kívül különböző celluláris folyamatokban bekövetkező változásoknak is szerepe lehet. Leggyakrabban a retinoblasztóma (RB) és a p53 tumorszuppresszor útvonalak érintettek, melyekben szerepet játszó tumorszuppresszor és egyéb regulatorikus fehérjékkel többek között az onkogén vírusok géntermékei (E6, E7, EBNA-LP, EBNA-3C, LMP-1) is kölcsönhatásba kerülhetnek.

### *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. 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. Permalignus lézióknak tekinthető például az orális leukoplakia (OL), az orális lichen planust (OLP) pedig jelenleg precancerosus állapotként tartják számon.

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. Az OL egyes változataihoz Candida fertőzés is társulhat, mellyel segítheti a lézió malignus transzformációját. Ezen kívül különböző virális faktorok szerepe is felmerült a betegség patogenezisében, úgymint HPV vagy az EBV, bár az EBV szerepét a HIV (humán immundeficiencia vírus) pozitív betegek orális hajas leukoplakiájának kontextusában vizsgálták a legtöbbit. A leukoplakia egyéb formáinak EBV pozitivitásáról jelen tudásunk szerint nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

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. Malignus transzformációra hajlamosító faktorok lehetnek például a cukorbetegség, a hepatitis C vírus (HCV), a gombás (Candida) fertőzések, a dohányzás, alkoholfogyasztás, rossz szájhigiéné és fogazati állapot. Ezen kívül felmerült a HPV és az EBV szerepe is a betegség kialakulásában és malignus transzformációjában, a víruseredetet azonban még nem bizonyították egyértelműen.

### ***Epstein-Barr vírus***

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. Genomját ikozahedrális szimmetriájú kapszid veszi körül. A burokkal rendelkező vírus átmérője 120-180 nm. Az EBV igen elterjedt, ubiquiter vírus, a populáció közel 90%-a fertőződik az élete során. Szeroepidemiológiai vizsgálatok szerint a primer fertőzés a fejlődő országokban már kisgyermekkorban bekövetkezik, mely a rosszabb életkörülményekkel és higiénéival magyarázható. 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 többi herpeszvírushoz hasonlóan az EBV esetében is megkülönböztetünk lítikus és látens életciklust. A lítikus ciklust aktív vírusprodukciónak 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<sup>6</sup> B-lymphocyta), mely során a vírus nem szaporodik. 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.

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 elsőként a nagyon korai gének expresszálódnak, melyek transzkripciós aktivátorokat kódolnak, szerepet játszanak a korai virális gének expressziójának szabályozásában és a gazdasejt egyes promótereinek aktiválásában. A korai gének replikációs proteinek kódolnak (pl.: virális DNS polimeráz) és szabályozzák a virális DNS replikációját. A késői gének pedig a virion felépítéséhez szükséges strukturális antigéneket (pl.: vírus capsid antigen, VCA) kódolják.

A látens fertőzés során 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 expresszálódnak. Az eltérő promóter használat és az ennek háttérében 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 expresszálódnak. 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.

### ***EBV fertőzéssel összefüggő betegségek***

A gyermekkorban történő primer EBV fertőzés általában tünetmentes vagy fiatal felnőtt korban mononucleosis infectiosa (MI) alakulhat ki, mely egy akut lefolyású betegség, legjellemzőbb tünetei a láz, torokfájás és a megnagyobbodott nyirokcsomók. A krónikus aktív EBV fertőzés (CAEBV) egy ritka, elhúzódó betegség, mely különböző szervi betegségekkel

(pneumonia, hepatitis, hematológiai elváltozások) jár együtt. 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). Az EBV a lymphoid eredetű tumorokon kívül az epithelialis eredetű rákos elfajulások kialakulásáért is felelős lehet. Szerepe lehet a nasopharyngealis carcinoma kialakulásában, gyomor carcinomában, nyálmirigyrákban vagy emlő carcinomában. Mindezek mellett szerepe lehet a fej-nyaki tumorokhoz tartozó orális laphámsejtes carcinoma (OSCC) valamint egyes orális premalignus betegségek (OL, OLP) kialakításában. A különböző tanulmányokat tekintve az EBV jelenléte a szájüregi mintákban nagyon változatos, mely alapján az EBV etiológiai szerepe OSCC-ben kétségessé válik.

### ***A sejtciklus és szabályozása***

A sejtciklus különböző fázisait bonyolult szabályzó rendszerek és ellenőrző pontok irányítják. A sejtciklus szabályozásában részt vesznek többek között különböző proto-onkogének, ciklin-dependens kinázok (CDK), transzkripciós faktorok, DNS „repair” gének, valamint tumorszuppresszor gének. A tumorszuppresszor gének a sejtosztódás antagonistái, a sejtciklust ellenőrzik és amennyiben a génállományban károsodás jön létre, leállítják a sejtosztódást vagy apoptózist indukálnak. 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/ciklinD) és a p53 (p53/p14ARF/MDM2) útvonalban szerepet játszó p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor gének.

### ***A p16<sup>INK4A</sup>, p14<sup>ARF</sup> tumorszuppresszor gének***

Az INK4A/ARF gén a humán 9-es kromoszóma rövid karján lokalizálódik. Erről a génről két tumorszuppresszor fehérje íródik át. A p16<sup>INK4A</sup> fehérjét a lókuszon elhelyezkedő exon 1α, exon 2 és exon 3 kódolják, a p14<sup>ARF</sup> fehérjét pedig az exon 1β - mely az exon 1α-t kb. 20 kilobázis távolságra előzi meg - valamint az exon 2 és exon 3 kódolja. A két fehérje különböző promótert használ, a közös második exon pedig eltérő leolvasási kerettel íródik át. Mindkét tumorszuppresszor fehérje a sejtciklus G1-S fázis átmenetét gátolja, eltérő

útvonalon. A p16<sup>INK4A</sup> 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<sup>INK4A</sup> fehérje közvetett úton képes gátolni a sejtciklus G1-S fázis átmenetét és az E2F-függő transzkripciót. A p14<sup>ARF</sup> 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<sup>ARF</sup> stabilizálja a p53-at a sejtmagban, amely az apoptózis és a hibajavító mechanizmusok indukciója szempontjából nélkülözhetetlen. A daganatok kialakulásában szerepet játszó, p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és epigenetikai változásokat számos különböző tumorban megfigyelték, mint például tüdő carcinomában, colorectalis tumorban, melanomában, emlődaganatban, illetve húgyhólyag carcinomában. A p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor gének és géntermékek a fej-nyaki tumorok tekintetében is az egyik leggyakrabban tanulmányozott markerek közé tartoznak. Ezen tumorszuppresszor géneket érintő változás lehet deléción, polimorfizmus, mutáció, a heterozigótaság elvesztése (loss of heterozygosity; LOH) vagy a promóter régiójukat érintő metiláció. Figyelembe véve, hogy a különböző fej-nyaki daganatok egy meglehetősen heterogén csoportot alkotnak etiológiájuk, szövettanuk, klinikai lefolyásuk és prognózisuk tekintetében, lehetséges, hogy ez a változatosság jellemző a tumorszuppresszor géneket érintő változások megjelenési gyakoriságára is. A leggyakoribb, tumorszuppresszor géneket érintő inaktiválódási mechanizmusok közé tartozik a LOH, deléción vagy a promóter metiláció. 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.

### ***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<sup>INK4A</sup> és p14<sup>ARF</sup> 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.

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### *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. Vizsgálati anyagként 65 orális laphámsejtes carcinomában (oral squamous cell carcinoma, 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 sejteket 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 leukoplakiában (OL; 14 férfi, 30 nő; átlagéletkor: 56,3 év, 29-91 év) szenvedő beteg léziójáról és egészséges nyálkahártyájáról gyűjtöttünk mintákat. 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, valamint a tumorok klinikopathológiai jellemzőit. A betegcsoportok adatait egy 68 főből álló egészséges kontroll csoport (16 férfi, 52 nő; átlagéletkor: 52,5 év, 22-77 év) adataival vetettük össze.

További munkánk során összesen 65 fej-nyaki régiót érintő tumoros beteg szövetmintájában vizsgáltuk a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> 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.

### *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.

### ***PCR és SSCP***

A minták DNS tartalmának kivonását követően, a DNS minőségének ellenőrzése a humán  $\beta$ -globin gén amplifikálásával történt, a pCO3 és pCO4 primerekkel. Az EBV genomjának detektálását nested PCR-rel végeztük, a vírus BamHI-W fragment internális ismétlődő régiójára specifikus primerek segítségével. Az INK4A/ARF lókuszon elhelyezkedő p14<sup>INK4A</sup> és p16<sup>ARF</sup> tumorszuppresszor gének exonjainak kimutatásához korábban leírt primerpárokat használtunk (Baur és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2000; Nagy és mtsai, 2003). A tumorszuppresszor génekben bekövetkező genetikai változásokat SSCP analízissel (single-stranded conformation polymorphism, egyszálú konformációs polimorfizmus) vizsgáltuk.

### ***Szekvenálás***

A genetikai változások pontosabb meghatározása érdekében, a kontrolltól eltérő futási mintázatot mutató mintákat szekvenáltattuk. A minták szekvenálását a DE OEC Klinikai Genomika Központban, az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft végezte. A szekvenciákat a GenBank adatbázisban található referencia szekvenciával (Génbanki azonosító: NG007485) hasonlítottuk össze.

### ***Metiláció-specifikus polimeráz láncreakció (MSP)***

A metilált és nem metilált promóterek megkülönböztetésére a mintákat Na-biszulfitos oldattal módosítottuk. A módosított DNS-t Wizard Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) segítségével tisztítottuk, követve a protokoll leírást. A p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> gének promótereinek metilációját Herman és munkatársai által korábban leírt metiláció-specifikus PCR-rel vizsgáltuk.

### ***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 pozitívitás 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  $p < 0,05$ .

## EREDMÉNYEK

### *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) tudunk 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 ketté osztottuk erózív 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.

### *Az EBV prevalencia adatainak statisztikai elemzése*

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 pozitív aránya összehasonlítva a kontroll és az OL csoporttal.

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

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.

### ***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.

### ***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 növeli a rossz prognózis esélyét. A teljes OSCC csoportban a tumor mérete (T) 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.

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.

### ***A tumorszuppresszor gének genetikai változásainak vizsgálata***

A kontroll csoportban összesen négy egyénnél mutattunk ki egy vagy több exont érintő deléció. Egy esetben detektáltuk a p16 exon 1 $\alpha$  hiányát és egy esetben pedig exon 2 deléció. Két egyénnél két-két exon amplifikációja volt sikertelen (p16 exon 1 $\alpha$  és 2, illetve p14 exon 1 $\beta$  és p16 exon 3). Az OSCC betegcsoportban csak egy betegnél nem sikerült a p16 exon 1 $\alpha$  kimutatása. Az LSCC csoportban összesen 21 egyénnél (75%) volt sikertelen a p16<sup>INK4A</sup> gén egy vagy több exonjának amplifikációja. Az egyes exonokra lebontva 19 esetben mutattunk ki exon 1 $\alpha$ , kilenc esetben exon 2 és két esetben az exon 3 hiányát, míg 10 esetben (35,7%) a p14<sup>ARF</sup> gén exon 1 $\beta$  hiányát detektáltunk. Az exon delécióval történő inaktivációt tekintve, összességében a p14<sup>ARF</sup> gént inaktív állapotban találtuk három egészséges egyénben és 14 LSCC-ben szenvedő betegben, míg az OSCC csoportban, egy betegben sem mutattuk ki a p14<sup>ARF</sup> gén inaktivációját. A p16<sup>INK4A</sup> 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 deléciójának 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 1 $\alpha$  nem kódoló régiójában egy homozigóta nukleotid csere a T24610A pozícióban, a másik ugyanezen exon kódoló régiójának C24702A pozícióban egy heterozigóta nukleotid csere, mely alanin $\rightarrow$ 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 $\rightarrow$ threonin (Ala140Thr) aminosav változást 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 p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor gének promóter metilációjának vizsgálata***

A p14<sup>ARF</sup> promóter metilációjának vizsgálata mind a 68 egészséges egyén, 30 OSCC beteg és mind a 28 LSCC beteg esetében volt sikeres, míg a p16<sup>INK4A</sup> promóterét az összes kontroll esetében, 29 OSCC és 21 LSCC betegnél sikerült megvizsgálni. Az egészséges kontroll csoportban sem a p14<sup>ARF</sup> sem pedig a p16<sup>INK4A</sup> promótere nem volt metilált, azonban a p14<sup>ARF</sup> promótere részlegesen metilált volt kettő, a p16<sup>INK4A</sup> 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 metilátlan állapotban.

Az OSCC betegek 86,7%-ban (26/30) a p14<sup>ARF</sup> promótert nem metilált állapotban találtuk. Három esetben mutattuk ki a p14<sup>ARF</sup> promóter részleges, míg egy esetben a teljes metilációját. A p16<sup>INK4A</sup> 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<sup>INK4A</sup> 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).

#### ***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 rosszabb tumormentes túléléshez vezet, azonban egyik tényező hatása sem volt statisztikailag szignifikáns. A szignifikancia értéke  $p=0,108$  és  $p=0,054$  volt OSCC és LSCC esetén.

## MEGBESZÉLÉS

Az orális laphámsejtes carcinoma (OSCC) kialakulását befolyásoló sokféle etiológiai tényezők közül a dohányzás és az alkoholfogyasztás emelhető ki, azonban nem dohányzó és alkoholt nem fogyasztó egyéneknél is kialakulhat a betegség. 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). 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. Ezen útvonalban szerepet játszó p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorsuppresszor gének és géntermékek az egyik leggyakrabban tanulmányozott markerek közé tartoznak a fej-nyaki tumorok körében.

Az EBV szerepe egyes tumorok esetén már bizonyítottan látszik, azonban a különböző irodalmi adatok alapján etiológiai szerepe az OSCC-ben illetve a különböző szájüreget érintő premalignus elváltozásokban még vitatott. Az alacsony EBV prevalenciáról beszámoló munkacsoportok szerint az EBV-nek nincs vagy csak elhanyagolható etiológiai szerepe van a betegség kialakulásában. Egy észak-európai munkacsoport az általuk is vizsgált fej-nyaki epithelialis tumorok egyikében sem mutatott ki EBV DNS-t, míg egy japán munkacsoport által vizsgált 46 OSCC-ből származó szövetminta közül mindössze hét bizonyult EBV pozitívnak.

Munkacsoportunk magas, a kontroll és a premalignus betegcsoportjainktól szignifikánsan eltérő EBV DNS pozitivitást (73,8%; 48/65) mutatott ki az OSCC betegcsoport tumorszövetében, amely összevethető azoknak a tanulmányoknak az adataival, melyek a vírus etiológiai szerepét feltételezik az OSCC kialakulásában. Japán tanulmányok OSCC-ben szenvedő beteg körében több mint 70%-os EBV DNS pozitivitást mutattak ki. Egy olyan területről származó betegpopulációt vizsgáltak, ahol a nasopharyngealis carcinoma is gyakori. Mások, az alkalmazott különböző érzékenységgű, EBV-re specifikus primerpároktól függően 100% illetve 50%-os EBV pozitivitást találtak OSCC betegmintákban. Az EBV szerepének megítéléséhez vizsgáltuk az LMP-1 virális protein expresszióját immunhisztokémiai módszerrel, de egyetlen EBV pozitív OSCC tumorszövetben sem tudtuk kimutatni az LMP-1 proteint. Hasonló eredményekről számolt be egy munkacsoport, 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. Egy másik kutatócsoport is vizsgált több virális transzkriptumot és fehérjét. Az alkalmazott érzékeny technikák ellenére azonban egy minta sem bizonyult 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 a vírus transzkripciók szempontból inaktív formában van, ezért nincs aktív, kóroki szerepe az orális carcinogenesis folyamatában. A vizsgált OSCC-ben szenvedő pácienseik 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.

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 rendelkező 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 jelenléte 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 tumorokban 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. 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 előfordulási gyakorisága, ami alapján az vírus etiológiai szerepe kevésbé 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.

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 egy munkacsoport, akik OSCC és OLP betegcsoportjukban szintén szignifikánsan magasabb EBV prevalenciát detektáltak a kontroll csoportjukhoz képest. A két rákmegelőző állapot közötti különbség a két betegség eltérő pathomechanizmusával magyarázható. Az OLP az szájüreg nyálkahártyájának krónikusan fennálló gyulladása. A betegség hátterében a T-sejt mediálta autoimmun hatás állhat, mint kóroki tényező. A folyamatok hátterében különböző citokinek, főként az  $\text{INF-}\gamma$  (interferon-gamma) és  $\text{TNF-}\alpha$  (tumor nekrosis faktor-alfa) fokozott termelése áll, mely végső soron az epithelialis sejtek apoptózisához vezet. A sejtek fokozott apoptózisát a környezetükben lévő aktivált  $\text{CD8}^+$  sejtek működése váltja ki. 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. Ezzel szemben az OL csoportban detektált alacsonyabb EBV prevalencia oka lehet, hogy az OL főként krónikus mechanikai vagy kémiai irritáció következménye és az EBV reaktivációját és ürülését segítő immunológiai változások nem jellemzőek erre a premalignus lézióra.

Az EBV etiológiai szerepét az OSCC patogenezisében azonban nem lehet teljesen kizárni, mivel lehetséges, hogy, hozzájárul a carcinogenesis folyamatához a tumoros betegségek egy részében. Viszont a vírus szerepe a tumor képződésben 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.

A 9-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő  $\text{INK4A/ARF}$  lókuszt által kódolt  $\text{p14}^{\text{ARF}}$  és  $\text{p16}^{\text{INK4A}}$  gének anomáliáit különböző típusú daganatokban figyelték már meg. A  $\text{p14}^{\text{ARF}}$  és  $\text{p16}^{\text{INK4A}}$  tumorszuppresszor gének fő inaktiválódási mechanizmusai közé tartozik a deléció, mutáció, valamint a promóter metiláció, melyek prevalenciája igen eltér az egyes tanulmányok között.. Egy több tanulmányt összefoglaló közleményben például a  $\text{p14}^{\text{ARF}}$  gént

érintő promóter metiláció gyakorisága 14% és 34% között változik, míg a p16<sup>INK4A</sup> gén metilációjának prevalenciája 5-68% közé tehető.

Eredményeinket tekintve, egyetlen OSCC betegmintában sikerült kimutatnunk p16<sup>INK4A</sup> gént (exon 1 $\alpha$ ) érintő deléciókat. Az általunk vizsgált LSCC betegcsoportban azonban a deléció fontos inaktiválódási mechanizmus lehet mindkét gén esetében. A p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> gének exonjait érintő deléció ugyanis szignifikánsan gyakrabban fordult elő az LSCC-ben 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). Egy másik munkacsoportnak is 68,6%-ban sikerült p16<sup>INK4A</sup> gén deléciókat detektálniuk 140 laryngealis laphámsejtes carcinomában szenvedő beteg tumoros mintájában. Statisztikai elemzésük szerint a p16<sup>INK4A</sup> deléciókat mutató betegeknek szignifikánsan kisebb esélyük van a tumormentes túlélésre, mint a deléciókat nem hordozó betegeknek.

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. Másrészt, a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> exonok delécióira utaló amplifikációjának a sikertelensége lehet az alkalmazott primerek kötődési helyét érintő, kisebb jelentőségű genetikai változások (polimorfizmus, mutáció, kisebb deléció) következménye.

Szekvenálási eredményeinket tekintve a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> 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 1 $\alpha$ -t érintette; az egyik a kódoló, a másik a nem kódoló régióban helyezkedik el. Az általunk detektált polimorfizmusok megegyeznek a már jól ismert polimorfizmusokkal és néhány polimorfizmusról leírták, hogy szerepe lehet bizonyos tumorok kialakulásában. Hasonlóan a mi adatainkhoz, egy munkacsoportnak mindössze három mutációt sikerült azonosítaniuk a 32 orális és maxillofaciális laphámsejtes carcinoma mintáikban, mely mutációk a p16<sup>INK4A</sup> exon 1 $\alpha$  és exon 2-t érintették. További két kutatócsoport is hasonlóan alacsony mutációs rátáról számolnak be, mely alapján ezeknek a mutációknak nem tulajdonítanak jelentős szerepet a betegség kialakulásában. Jelenlegi vizsgálati csoportjainkban, úgy tűnik, hogy a p16<sup>INK4A</sup> gént érintő polimorfizmusoknak nincs nagy jelentőségük, mivel minden általunk detektált változás, mely a kódoló régiót érintette, heterozigóta volt.

Metiláció-specifikus PCR eredményeink alapján a promóterek metilációs állapota a p16<sup>INK4A</sup> gén esetében mérsékelten fontos funkcionális inaktiválódási mechanizmust jelenthet, míg a p14<sup>ARF</sup> esetében a promóter metilációs státusz kevésbé fontos. Hasonlóan két munkacsoport által prezentált eredményekhez, több mintában is részleges metilációt mutattunk ki, azaz a metilált szignál mellett ugyanabban a mintában megjelent a nem metilált jel is. Ez nemcsak a promóter régió részleges metiláltságából adódhat, hanem a tumorszövet heterogén szövettani összetételéből is. Figyelembe véve, hogy a metiláció specifikus PCR egy igen érzékeny módszer, a szövetszövetmintába kerülő kis mennyiségű (esetünkben nem metilált) normál szövet metiláltsági fokát is kimutathatja. Jelen tanulmányunkban a p16<sup>INK4A</sup> metilációja szignifikánsan gyakrabban fordult elő OSCC-ben és LSCC-ben, mint az egészséges csoportban. A statisztikai eredményeink pedig azt mutatták, hogy a p16<sup>INK4A</sup> metilációja kedvezőtlenül befolyásolhatja az OSCC-ben szenvedő betegek tumormentes túlélését, bár az eltérés nem volt szignifikáns ( $p=0,108$ ). Egy tanulmány szerint a p16<sup>INK4A</sup> promóter hipermetilációja gyakrabban fordult elő azokban az orális epithelialis dysplasiákban, ahol a malignus transzformáció esélye nagyobb volt. Ezek alapján a p16<sup>INK4A</sup> promóter metilációja ígéretes biomarkernek tűnik a dysplasia malignus transzformációjának predikciója szempontjából. Vizsgálataink során a p14<sup>ARF</sup> 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 közepesen fontos vagy fontos inaktiválódási mechanizmus lehet a fej-nyaki tumorok és egyéb tumorok kialakulásában.

Adataink a tumorgenezis során bekövetkező sokféle genetikai esemény fontosságára hívják fel a figyelmet, valamint arra, hogy a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorszuppresszor géneket érintő promóter metiláció gyakorisága eltérő lehet a különböző fej-nyaki daganatok 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<sup>INK4A</sup> gént érintő) tekinthető az általunk vizsgált genetikai és epigenetikai eltérések közül a leggyakoribbnak; LSCC-ben pedig a gének promóter metilációja valamint az exonok deléciója játszhat szerepet a gén inaktiválódásban. A kontroll populációban a gének genetikai változásait kisebb arányban mutattuk ki. Bár a genetikai változások túlélésre gyakorolt hatásának statisztikai adatai nem mutatnak szignifikáns eltérést, de közel vannak a szignifikancia határértékhez. Hatásuk pontosabb megítéléséhez és szignifikáns adatok detektálásához egy nagyobb számú populáció vizsgálata szükséges.

## 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 prevalenciájáról illetve a fej-nyaki daganatok esetén a p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> 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 régióként, populációként és tumor típusonként 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 sejtjeit is. Pusztán a léziók EBV hordozását vizsgálva, eredményeink szerint az OSCC-ben és OLP-ben szenvedő betegek léziójában gyakori az EBV jelenléte, 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 tumorigenezis szempontjából fontos p14<sup>ARF</sup> és p16<sup>INK4A</sup> tumorsuppresszor 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 deléciónak 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<sup>INK4A</sup> 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<sup>INK4A</sup> gént érintő promóter metiláció esetünkben egy mérsékelten fontos inaktiválódási mechanizmust jelenthet, míg a p14<sup>ARF</sup> metilációja kevésbé fontos a fej-nyaki daganatokban. A carcinogenesis során végbemenő, tumorszuppresszor géneket érintő genetikai és epigenetikai változások tumor típusonként, földrajzi régióként és ebből kifolyólag táplálkozási, dohányzási és kulturális szokásonként valamint a populációt ért környezeti ártalmaktól függően eltérőek lehetnek.

# AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ÉS EGYÉB KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK



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

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

## 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



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518–600  
E-mail [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [lib.unideb.hu](http://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 papillomatosis 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  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK



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-uridylylate (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., Szöllösi Z., Kis A., Oláh É.: Az Epstein-Barr vírus ZEBRA fehérjéjének expressziója magyarországi Hodgkin lymphomás betegekben: Látnak 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 alapján szolgáló közleményekre): 3,762

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

Debrecen, 2014.09.04



## **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE**

**Andrea Kis**, Enikő Fehér, Etelka D. Tóth, Róbert Boda, Ildikó Márton, Ildikó Tar, Zoltán Beck, Krisztina Szarka: Investigation of EBV prevalence in oral squamous cell cancer and in oral leukoplakia.

Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 15-17, 2008, Keszthely, Hungary

**Andrea Kis**, Tamás Gáll, Csilla Péter, Attila Nochta, Krisztina Szarka: Genetic and epigenetic alterations in the INK4A/ARF tumor suppressor locus in head and neck cancer.

Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 13-15, 2010, Keszthely, Hungary