

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A cholesteatoma progressziójában résztvevő
tumorszupresszor, protoonkogén, citokeratin és proteáz
fehérjéket kódoló gének vizsgálata**

Dr. Palkó Enikő

Témavezető: Dr. Penyige András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
I. Bevezetés	6
II. Irodalmi Áttekintés	9
2.1. A cholesteatoma klasszifikációja és patomechanizmusa a konvencionális elméletek szerint.....	9
2.1.1. Congenitalis cholesteatoma	10
2.1.2. Szerzett cholesteatoma.....	11
2.2. A cholesteatoma progressziójában szerepet játszó faktorok.....	12
2.2.1. Gyulladás mediáló faktorok a cholestatomában	12
2.2.1.1. <i>Citokinek, sejtfelszíni és adhéziós molekulák a cholesteatomában</i>	14
2.2.1.2. <i>Biofilm képződés és szerepe a cholesteatomában</i>	16
2.2.2. Angiogenezis.....	17
2.3. Csontanyagcsere és immunológiai folyamatok a cholesteatomában.....	18
2.4. Tumorigenezis	19
2.5. Genetikai rendellenességek cholesteatomában	20
2.5.1. Kromoszómális eltérések vizsgálata	21
2.5.1.1. <i>Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH) vizsgálatok</i>	21
2.5.1.2. <i>A cholesteatoma genetikai hátterének vizsgálata nagy teljesítményű molekuláris módszerekkel</i>	22
2.6. A cholesteatoma és az apoptózis.....	24
2.6.1. Sejt proliferáció és az apoptózis	24
2.6.2. Humán papillomavírus fertőzés cholesteatomában	25
2.7. Az általunk vizsgált gének jellemzése és feltételezett szerepük a cholesteatomában	26
2.7.1. A MYC géncsalád, a c-MYC szerkezete és funkciója.....	26
2.7.1.1. <i>A c-MYC és a cholesteatoma</i>	28
2.7.2. TP53 gén	28
2.7.2.1. <i>A TP53 és a cholesteatoma</i>	29
2.7.3. Citokeratinok.....	30

2.7.3.1. <i>Citokeratin 1 és 10</i>	30
2.7.3.2. <i>Citokeratin 19</i>	31
2.7.3.3. <i>A cholesteatoma és a citokeratinok</i>	31
2.7.4. MMP géncsalád tagjai.....	33
2.7.4.1. <i>MMP9 és a cholesteatoma</i>	33
III. Célkitűzések	35
IV. Anyagok és módszerek	37
4.1 Mintagyűjtés.....	37
4.2. Molekuláris genetikai módszerek	38
4.2.1. A teljes RNS készlet izolálása műtéti mintákból.....	38
4.2.2 Az izolált RNS molekulák átírása cDNS-é.....	39
4.2.3. Real-time (valós idejű) qPCR reakció	39
4.2.4. Statisztikai elemzés	40
V. Eredmények	41
5.1. Klinikai jellemzők.....	41
5.2. Gének expressziójának vizsgálata.....	42
5.2.1. A c-MYC gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma, atheroma mintákban ...	43
5.2.2. A KRT1 és KRT10 gének expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban..	48
5.2.3. A KRT19 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban.....	51
5.2.4. A MMP9 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban	52
5.2.5. A TP53 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban.....	56
5.3. Esettanulmány	57
VI. Megbeszélés	59
6.1. A PhD értekezés új eredményeinek rövid összefoglalása	66
VII. Összefoglalás	68
VIII. Irodalomjegyzék	73
IX. Tárgyszavak / Keywords	83
X. Köszönetnyilvánítás	84
XI. Publikációs lista	85
XII. Függelék	86

Rövidítések jegyzéke

Bcl-xL – B-cell lymphoma-extra large, nagy B sejtés lymphoma

BCL2 – B cell lymphoma 2, B sejtés lymphoma gén

bHLHLZ – basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor, bázikus hélix-hurok-hélix-leucin cipzár transzkripció faktor

CEACAM – carcinoembryonic antigen- related cell-adhesion molecule, karcinoembrionális antigénhez kötődő sejtadhéziós molekula

CD31- cluster of differentiation, platelet endothelial cell adhesion molecule
vérelmeke endothelialis sejtadhéziós molekula

CDK – ciklin dependens kinázok

DNS – dezoribonukleinsav

ECM – extracelluláris mátrix

EGF – epidermal growth factor, epidermális növekedési faktor

EGFR – epidermal growth factor receptor, epidermális növekedési faktor receptor

FISH – fluoreszcens in situ hibridizáció

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor

HPV – humán papillomavírus

ICAM – intercellular adhesion molecule, intercelluláris adhéziós molekula

IFN – interferon

IGF-1 – insulin-like growth factor, inzulinszerű növekedési faktor

IL- interleukin

kDa - kilodalton

KGF – keratinocyte growth factor, keratinocita növekedési faktor

KRT – cytokeratin

Mdm2 – mouse double minute 2, egér dupla minut 2

NFkB – nuclear factor kappa B, nukleáris faktor könnyűlánc ligand a B limfocitán

NID2 – Nidogén 2

PTEN – foszfatáz és tensin homológ gén

PDGF – vérlemezke eredetű növekedési faktor

PTHrP – mellékpajzsmirigy hormonnal rokon fehérje

RANK – receptor activator of nuclear factor kappa-B, nukleáris faktor kappa-B receptor
aktivátor

RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, nukleáris faktor kappa-B
receptor ligand

RNS – ribonukleinsav

TFIIH – transcription factor II human, II. transzkripció faktor

TGF – transforming growth factor, transzformáló növekedési faktor

TNF – tumor necrosis factor, tumor nekrosis faktor

tPA – szöveti plazminogén aktivátor

VCAM – vascular cell adhesion molecule, vaszkuláris sejtadhéziós molekula

I. Bevezetés

A középfülbe lokalizálódó cholesteatoma széles körben elterjedt fülbetegség, ami krónikus gyulladással járó folyamat eredményeként alakul ki. A krónikus cholesteatomás középfülgyulladás prevalenciája földrészenként különböző, fejlettebb területeken alacsonyabb, míg a szociálisan elmaradottabb régiókban magasabb az előfordulása. A betegség európai incidenciája gyermekek esetében 3/10000, illetve felnőtteknél 9/10000. A felsőlélegúti hurutos megbetegedések gyakori szövődményeként fordul elő a középfülgyulladás (otitis media). Az otitis mediát okozó faktorok krónikus fennállásakor a cholesteatoma képződés lehetősége fokozott.

A cholesteatoma leírására patológiai megjelenése, jellegzetes színe és zsákszerű volta alapján 1829-ben Cruveilhier a gyöngyház tumor kifejezést használta, a tumort a temporális csontba lokalizálta. Magát a cholesteatoma kifejezést először Johannes Müller használta 1838-ban. A nevet a betegség jellegzetes megjelenése alapján a cholesterol, a steat (zsír) illetve oma (daganat, tumor) szavakból képezte, értelmezésében tehát a cholesteatoma a zsírszövet gyöngyház tumora.

A medicinában számos keratinózus ciszta ismert, többek között az epidermalis ciszta (atheroma) és a cholesteatoma. A cholesteatoma a középfülben elhelyezkedő ectopiás keratinózus ciszta, melyet lokálisan invazívitás jellemez. Hisztológiailag a ciszta fala többrétegű elszarusodó laphám, melyet mátrixnak neveznek. A mátrix sejtei által termelt keratin, mely folyamatosan újratermelődik, majd leválik, törmelékét képez a ciszta belsejében. Ezzel a cholesteatoma mérete nő, egyre kiterjedtebbé válik. Ebből a

növekedéséből származik invazivitása, számos, különböző súlyosságú szövődmenyt okozva a középfülben. Leggyakoribb a hallócsontláncolati destrukció, halláscsökkenés, fülfolyás, szédülés és az intracraniális szövődmenyek. A cholesteatoma terápiája a műtéti eltávolítás. Még gondos sebészi kimetszés után is magas a betegség recidiva hajlama főként a gyermekkori esetekben, ezért gyógyítása a mai napig is nagy microchirurgiai kihívást jelent a fül-orr-gégészek számára.

Az atheroma – vagy kásadaganat – egy benignus tumor, szövettanilag nagyon hasonló a cholesteatomához, de klinikai viselkedésük eltérő. Sebészi kimetszése után a kásadaganat szinte szövődmeny nélkül gyógyul.

A cholesteatoma patomechanizmusa még napjainkban is csak részben ismert. A konvencionális elméletek alapján a cholesteatoma kialakulására az irodalomban számos olyan teóriát találunk, mely szerint a cholesteatoma kialakulása háttérében a középfül struktúrájára jellemző élettani és anatómiai viszonyok megváltozása áll. Ezek alapján a cholesteatoma két etiológiai csoportját különböztetjük meg, congenitalis és szerzett formáját. A legújabb tanulmányok a cholesteatomára jellemző irreguláris terjedés, a proliferáció háttérében álló molekuláris és citogenetikai elváltozásokat vizsgálják, ezek azonosításával és analízisével feltételezhetően pontosabb ismereteket kaphatunk a cholesteatoma kialakulására és viselkedésére vonatkozóan.

Munkánk során hat gén – a c-MYC, TP53, MMP9, KRT1, KRT 10 és KRT19 - expressziós mintázatát vizsgáltuk műtétieltávolított cholesteatoma sejtekből izolált össz RNS mintákban, kontrollként retroauricularis régióból vett normál bőrből származó mintákat használtunk. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk lehet-e szerepe a vizsgált géneknek a cholesteatoma kialakulásában, agresszív viselkedésében, illetve található-e onkológiai eltérés cholesteatomában. A c-MYC protoonkogén esetében a cholesteatomára jellemző expressziós

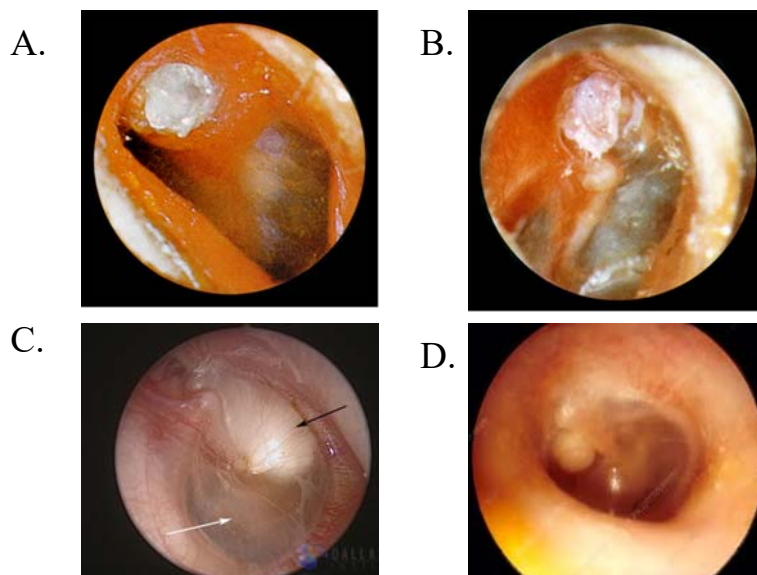
szintet összehasonlítottuk a benignus atheroma daganat sejtjeire jellemző génexpressziós szinttel is.

Összefoglalva tehát, a dolgozatban leírt kísérletek célja a cholesteatoma agresszív viselkedésének molekuláris hátterében álló mechanizmusok vizsgálata volt. Remélve, hogy eredményeink néhány új részlettel szolgálnak a cholesteatoma patomechanizmusának magyarázatára.

II. Irodalmi Áttekintés

2.1. A cholesteatoma klasszifikációja és patomechanizmusa a konvencionális elméletek szerint

A konvencionális elméletek a cholesteatoma növekedését, patogenezisét több teóriával magyarázzák. Ezek alapján a cholesteatomának etiológiai szempontból két csoportja van: szerzett és veleszületett cholesteatoma (1. ábra). A szerzett csoporton belül további két altípust különböztetnek meg; primer- és szekunder szerzett altípusokat (1,2).



1. Ábra. Szerzett és congenitális cholesteatomák fültükri képe. Szerzett cholesteatoma (A. és B); congenitális cholesteatoma (C és D). Az ábra C. részén a sötét nyíl mutatja a cholesteatomát. (www.fulspecialista.hu)

2.1.1. Congenitalis cholesteatoma

A congenitalis cholesteatoma egyfajta fejlődési rendellenesség, mely általában a 3-4. magzati hét körül alakul ki, amikor a velőbarázda velőcsővé záródása történik. Az embrionális életben a kialakuló temporális térség szövetvándorlási történései közben leszakadó, elszarusodó laphámsejtek vagy sejtszigetek rendellenes mesodermális tájékra kerülnek. A hámsejtek funkciójuknak megfelelően keratint termelnek, azonban ez a keratin nem tud ürülni, mivel ezeknek a sejteknek nincs kapcsolatuk a külvilággal. A hámsejtekből és az általuk termelt, felhalmozódó keratinból egy úgynevezett retrakciós hámzsák jön létre, melyből congenitalis cholesteatomás gyöngy képződik. A veleszületett cholesteatoma a koponyán belül elhelyezkedhet intraduralisan és extraduralisan. Extraduralisan elsősorban a koponyát alkotó sziklacsontban és környezetében fordul elő, leggyakrabban a hallójárat, a középfül, a csecsnyúlvány területén és a sziklacsont csúcsán (3). A congenitalis cholesteatoma tünettanának kritériumrendszerét több csoport is vizsgálta, ezért többféle álláspont létezik: Derlacki és Clemis nézete szerint a cholesteatoma ezen fajtájánál a dobhártya ép, intakt, illetve nem előzi meg fertőzőes periódus. Ezt az elméletet Friedman és munkatársai cáfolták, hiszen vizsgálatuk során az érintett gyerekek többségének legalább egy otitis mediás periódusa volt. Levinson és munkatársai nevéhez fűződik a legpontosabb kritériumrendszer. Szerintük az intakt dobhártyától mediálisan helyezkedik el egy fehér, úgynevezett cholesteatomás massa, a pars flaccida és pars tensa viszont intakt. A betegeknél nem tapasztalható fülfolyás, nem volt előzőleg fülészeti beavatkozás, nincs hallójárat atresia és intramembránózus cholesteatoma, de nem zárják ki az otitis media meglétét. A congenitalis cholesteatoma átlagosan 4,5 éves korra alakul ki. Fiú dominanciát mutat, a fiú lány arány 3:1 (4, 5).

2.1.2. Szerzett cholesteatoma

A primer szerzett cholesteatoma az Eustach-fülkürt diszfunkciójából származik. A szekunder szerzett cholesteatoma patogenezise azon alapszik, hogy fülészeti beavatkozás során a dobhártyáról leszakadó epitélium a középfülbe jut. Ilyen beavatkozás lehet pl. a ventilációs tubus behelyezése, paracentesis, operáció (5).

A szerzett cholesteatoma patogenezisére öt alaptéória van. 1) A stratum basale hiperpláziája az elszarusodó laphámban. 2) Az epithelium sejtjeinek migrációja a perforált dobhártyán keresztül addig tart, ameddig egy másik epitheliummal fedett felszínhez nem ér. Ezt a migrációs jelenséget „contact guidance”-nak, míg a találkozás okozta megállást „contact inhibition”-nak nevezzük. 3) A középfül lapos kuboidális sejtjeinek metaplasztikus transzformációja elszarusodó laphámmá. 4) A dobhártya invaginációja az élettani viszonyok megváltozása miatt. 5) Rüedi, illetve Aimi elmélete szerint fejlődési rendellenességként, vagy később a születés után folyamatos hallójáratirritáció hatására elszarusodó laphámsejtek, vagy hámcsapok nyomulhatnak be a dobüregbe (6).

A legelfogadottabb patomechanizmus ezek közül a dobhártya *invaginációja*. A nem megfelelően kezelt hurutos-savós középfülgyulladás súlyosbodásának egyik következménye lehet, hogy az elvékonyodott, atrófiás dobhártya beöblösödik a dobüreg, majd a mastoid rendszer térségébe. Mindez a középfül anatómiai- és nyomás viszonyainak megváltozásából adódhat (7).

2.2. A cholesteatoma progressziójában szerepet játszó faktorok

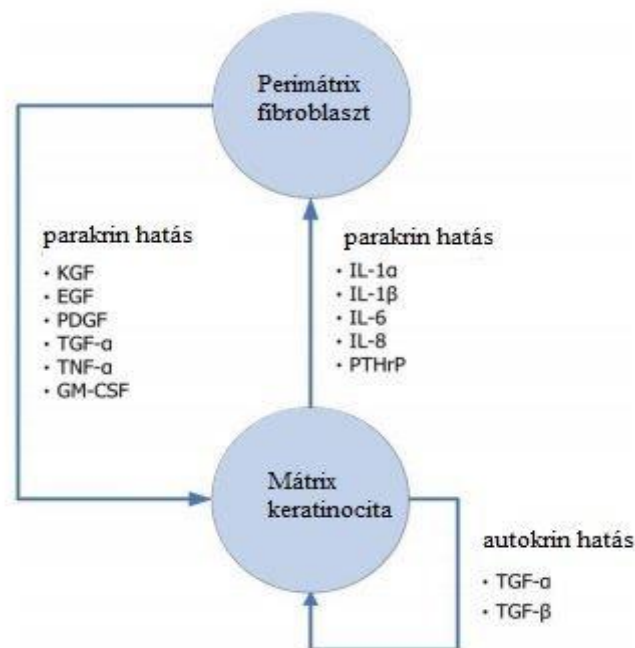
A cholesteatoma három évszázada ismert betegség, de etiopatogenezise máig is vizsgálatok tárgyát képezi. Számos mechanizmust írtak már le a szerzett cholesteatoma kialakulására vonatkozóan, de azok általában nem adnak magyarázatot a cholesteatoma számos klinikai jellegzetességére, a koordinálatlan sejtproliferációra, invazivitására, megváltozott differenciációs folyamatára, agresszivitására, illetve recidiva hajlamára. Az utóbbi években azonban már néhány modernebb, ún. „high-throughput” molekuláris módszerek felhasználásával elvégzett vizsgálat eredményei is közlésre kerültek a szakirodalomban (2).

2.2.1. Gyulladást mediáló faktorok a cholestatomában

A cholesteatoma alapját feltehetően egy krónikus gyulladós folyamat képezi. A legújabb tanulmányok szerint a középfülben ennek a folyamatnak direkt és indirekt úton szerepe van a cholesteatoma agresszív viselkedésében.

Több kutatócsoport is próbált azonosítani a cholesteatoma progressziójában szereppel bíró mediátorokat, hogy ismertebbé váljanak a cholesteatomára jellemző cellularis, molekuláris diszfunkciók. A cholesteatoma progressziójában egy komplex immunológia folyamat áll, melynek alapja egy krónikus, régóta fennálló gyulladós folyamat. A folyamat részeként szignál transzdukciós útvonalak aktiválódnak, melyek génexpressziós változásokat, enzimek termelődését vagy aktivitás változását okozhatják, illetve elvezethetnek akár kromoszóma aberrációk kialakulásához is (8, 9).

A cholesteatoma progressziója a cholesteatoma mátrix sejtjeinek, az őket körülvevő extracelluláris mátrix komponenseinek, a sztrómális rétegben található fibroblasztok és a vérereket tartalmazó perimátrix kölcsönhatásai révén valósul meg. A mátrixban és perimátrixban zajló gyulladási folyamatok során parakrin és autokrin ható citokinek (IL- α , IL- β , IL6, IL8, TGF- α , TGF- β , TNF- α , KGF, EGF) termelődnek (2. ábra). Az aktiválódott citokin kaskád a mátrix-perimátrix rétegekben komplex változásokat hoz létre, mely az extracelluláris mátrix átrendezéséhez, lebontásához, a leukociták szövetekbe való kijutásához vezet. Az extracelluláris mátrix bontásában proteolitikus enzimek - szerinproteázok, a mátrix-metalloproteázok és a cisztein proteázok - vesznek részt. Az extracelluláris mátrix és a bazális membrán degradációja, lebontása növekedési faktorok, illetve további citokinek felszabadulásával jár, ami lehetővé teszi a cholesteatoma sejtjeinek további proliferációját és a daganat inváziójával kapcsolatos folyamatokat (8, 9, 10).



2. Ábra. Mátrix és perimátrix kölcsönhatásában résztvevő citokinek. A mátrix keratinocitáit és perimátrix sejtjeit érintő gyulladási folyamatban résztvevő parakrin és autokrin hatású citokinek. (Kuo et. al. Laryngoscope, 2015.)

2.2.1.1. Citokinek, sejt felszíni és adhéziós molekulák a cholesteatomában

A sejtek közötti jelátvitelben jelentős szerepet töltenek be az igen kicsiny koncentrációban is hatékony polipeptid molekulák, a citokinek. A citokin családba tartozó növekedési faktorok és interleukinek számos biológiai hatást közvetítenek (10).

A cholesteatoma képződés szempontjából fontos lehet, hogy az interleukinek parakrin módon befolyásolhatják a keratinocita differenciációt, proliferációt. Több kutatócsoport is vizsgálta jelenlétüket cholesteatomában. Bujia és munkatársai egy tanulmányukban az interleukin-1 (IL-1) cholesteatomában betöltött szerepét vizsgálták. Az IL-1-nek két altípusa van, az interleukin-1 α (IL-1 α) és az interleukin-1 β (IL-1 β) de az IL-1 mindkét típusa egyazon receptoron keresztül fejt ki biológiai hatását. Különböző sejtek termelik a két altípust, az IL-1 α a keratinociták, míg az IL-1 β a monociták és a makrofágok. Bujia és munkatársai az IL-1 expresszióját vizsgálták a cholesteatoma mátrixában, kontrollként normál külső hallójáratiban használva. Az IL-1 overexpresszióját a cholesteatoma mátrix suprabazális rétegében figyelték meg. Elvértve detektáltak IL-1 expressziót a sztrómális rétegben is. Az IL-1 α a bőrben található, az immunrendszerhez tartozó antigénprezentáló specializált dendritikus sejtekre, Langerhans sejtekre is hat (11). Kamide és munkatársai tanulmányukban kimutatták, hogy a Langerhans sejtek fontos szerepet játszanak a keratinociták hiperproliferációjának stimulálásában azáltal, hogy hatnak a keratinociták terminális differenciációjában résztvevő transzglutamináz enzimre (12). Az IL-1 különböző mechanizmusok révén hat a csont reszorpcióra is. Mundy és munkatársai szerint az IL-1 stimulálja a fibroblasztok kollagenáz és prosztaglandin termelését. Az IL-1 szabályozza a polimorfonukleáris neutrofil sejteket, illetve az oszteoklasztokat közvetlenül is aktiválja. Az IL-1 stimulálja a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) termelését és hat a monocita és multinukleáris

oszteoklasztszerű sejtek kemotaxisára is (13). Az IL-1 a normál epidermiszben is kimutatható. A szerzők a megnövekedett IL-1 szintet a cholesteatomára jellemző hiperproliferációs és csontdestrukciós folyamatokkal hozták összefüggésbe (11).

In vitro kísérletekben vizsgálva a GM-CSF hatását megállapították, hogy e faktor stimulálja a sejtproliferációt és a keratinocita képződést. A GM-CSF az epitélium suprabazális rétegében lokalizálódik, illetve a szubepitéliális rétegben, a monocitákban és a fibroblasztokban is kimutatták jelenlétüket (14). Az IL-1 α és az IL-1 β diffúzan megtalálható a cholesteatoma epitéliumában és annak sztrómális infiltrációjában is.

Az IL-6 a cholesteatoma mátrixában és a sztrómájában található. Az IL-6 overexpressziója a cholesteatomában valószínűsíti, hogy e citokinnek szerepe van az epitéliális proliferációban és a csontdestrukciós folyamatokban (15).

Kuczkowski és munkatársai a TNF- α , IL-1 α és IL-6, TGF- β és az EGFR expresszióját vizsgálták a cholesteatomában. A normál bőrhöz viszonyítva emelkedettebb expressziós szintet detektáltak, illetve az expressziójuk szintje korrelált a csontdestrukció mértékével (16).

Számos kutatócsoport vizsgálta a cholesteatomában a sejtfelszíni, adhéziós molekulák és a citokinek jelenlétét és egymásra hatását. IFN- γ és az IL-1 indukálja a keratinociták sejtfelszínén található ICAM-1 molekulát. A mátrixban és a perimátrixban az ICAM-1 és az ELAM-1 az immunválasz modulálásában vesz részt. Az ICAM-1/LFA-1 közötti interakció is fontos szerepet kap a lokális inflammatorikus reakcióban az epitéliális és sztróma sejtek határán. Az IFN- γ növeli az EGFR expresszióját, így elősegíti a TGF- α általi keratinocita képződést (17).

Welkoborsky és munkatársai 40 felnőttből és 14 gyerekből származó cholesteatoma mintákat vizsgáltak. Analízisük során az α 1 β 6-integrin, E cadherin, ICAM, α és β 5 integrin, V-CAM és fibronectin közvetítette sejt-sejt közötti interakciókat és az epitélium-sztróma interakciót vizsgálták. Eredményeik igazolták, hogy a gyermek és felnőttkori esetekben az

extracelluláris mátrix komponenseinek expressziója, struktúrája eltérő volt. A különbség a gyulladás extravazációs stádiumának intenzívebb jelenlétére utal a gyermekkori esetekben, mely egy fokozottabb gyulladásos folyamatot, terjedést is valószínűsít (18). Quaranta és munkacsoportja is azt állapította meg, hogy a gyermekkori cholesteatomás esetekben a gyulladás mértéke nagyobb a felnőttkorihoz képest (19). A Dornelles munkacsoport által végzett munka eredményei szerint is a perimatrix - mely cholesteatomában egy gyulladásos környezet – a gyerekek esetében nagyobb rétegvastagságú a felnőttekéhez képest (20).

Összegezve: a keratinociták által termelt interleukinok a fibroblasztokban citokinek termelését indukálják. A cholesteatomában detektált citokinek mind a mátrixban, mind a perimatrixban megtalálhatóak, pozitív feedback mechanizmus révén fokozzák egymás termelődését, fenntartva ezzel a gyulladásos folyamatot.

2.2.1.2. Biofilm képződés és szerepe a cholesteatomában

A cholesteatomára jellemző, középfület érintő krónikus gyulladásos folyamat gyakran rezisztens antibiotikum kezelésre, ami mikrobiális eredetű biofilm képzéssel hozható összefüggésbe.

A biofilm szilárd felületen kialakuló, baktérium sejtek egybefüggő bevonatot képező rétegeiből áll, melyben a baktériumok az általuk szekretált extracelluláris polimer molekulákba ágyazottan helyezkednek el. A biofilm képződés fontos tényezője a krónikus bakteriális fertőzéseknek, ugyanis a biofilm képzés megváltoztatja a baktériumok fiziológiai állapotát, génjeik expressziós mintázatát, pl. rezisztencia gének aktiválódnak, így sokkal nehezebben kezelhető antibiotikumokkal a fertőzés (21).

Cholesteatomás esetekben is tapasztalható biofilm képződés a középfülben, leggyakrabban *Pseudomonas aeruginosa* sejtek mutathatóak ki a biofilmben. A cholesteatoma

sejtjeiben folyó aerob metabolikus folyamatok következtében kialakuló oxidatív stressz és az antioxidánsok szintjének csökkenése bioflim fokozott produkciójával járhat együtt. (22, 23, 24).

2.2.2. Angiogenezis

A sejtburjánzás egyik alappillére az angiogenezis. A sejtek életműködéséhez nélkülözhetetlen az oxigén, melyet a szöveteknél a velük teljes összhangban növekvő, differenciálódó és az őket kellő sűrűséggel behálózó hajszálérrendszer biztosít. Folkman szerint a szolid tumorok egy bizonyos nagyság felett már nem képesek csupán diffúzió útján hozzájutni az oxigénhez és a tápanyagokhoz, hanem újonnan kialakult kapillárisokra van szükségük. Az új erek szerkezete eltér a normális erekétől: szabálytalanok, csavarodottak, simaizomelemeik hiányoznak, endotél bélésük és bazális membránjuk elégtelen, amelyeket a tumorsejtek folyamatosan bontanak is. Az angiogenezis a szöveti hypoxia hatására a daganat- és sztrómasejtekből felszabaduló angiogenetikus faktorok (pl. VEGF) hatására indul meg (10). Ez az angiogenikus átkapcsolás a daganatok rosszindulatúvá válásának, korlátlan növekedésének egyik alapfeltétele.

Asher és munkatársai felnőtt - és gyermekkori cholesteatomák szubepiteliális angiogenezisét vizsgálták a perimatrixban a CD31 sejtfelszíni marker segítségével. Eredményeik szerint a gyermekkori esetekben magasabb volt a CD31 szint és a fokozott érépződés korrelált a gyulladással. Ezen eredmények alapján az angiogenetikus faktorok jó biológiai markereknek bizonyulnak a betegség progresszivitására vonatkozóan (25).

2.3. Csontanyagcsere és immunológiai folyamatok a cholesteatomában

A cholesteatoma terjedése során roncsolja a környező csontállományt. A középfül több üregrendszerét is érintheti a csontdestrukciós folyamat. Károsodhat a hallócsontláncolat, a gyulladás a dobüregből a középfül körüli képletekre is ráterjedve számos súlyos szövődeményt okoz, illetve betörhet a koponyába is.

A csontdestrukció hátterében részben maga a cholesteatomás cisztózus képlet méretének növekedése, mint mechanikai hatás áll. Másrésztől számos molekuláris interakciónak is köszönhetően a csontanyagcsere egyensúlyának felborulása is jellemző ebben a betegségben (26).

Legújabb ismeretek szerint cholesteatomás megbetegedésben a csontpusztulás hátterében szerepet játszhat a kialakult biofilmben lévő baktériumok anyagcsereje következtében kialakuló alacsony pH érték, valamint szerepet játszhat a termelő citokinek által felerősített és állandósuló lokális gyulladás szövetkárosító, csontlebontó hatása is. A leghatékonyabb oszteoklaszt aktiváló citokinek a TNF- α , IL1- β és IL- α és IL6, melyek a cholesteatoma patomechanizmusában is szerepet játszhatnak (27).

Számos kutatócsoport igazolta cholesteatomában a fokozott oszteoklaszt érési és aktivitási folyamatot, a RANK-RANKL rendszer megemelkedett expresszióját, mely fokozott csontpusztulási folyamatot okozhat. A normál bőrhez viszonyítva a cholesteatomában magasabb volt a CD4, CD11a, CD11b, CD14 és CD68 sejtfelszíni markerek expressziója az oszteoklaszt prekursorokban és makrofágokban. Ez az eredmény is egy fokozottabb csontbomlási folyamatot támaszt alá (28, 29).

Iwamoto és munkatársai eger kísérletekben a cholesteatomához nagyon hasonló modellt használva epidermális cisztaszerű szövetet ültettek be az állatokba, ami oszteoklaszt

képződést indukált. Továbbá egy keratinocitákból, fibroblasztokból és oszteoklaszt-prekurzorokból álló in vitro sejt kultúrát is használtak annak bizonyítására, hogy a keratinociták stimulálják az oszteoklasztok differenciálódását a fibroblasztokban található RANKL gén indukciója révén. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a keratinociták és a fibroblasztok közötti intercelluláris kommunikáció részt vesz az oszteoklasztok differenciálódásában és működésében (30).

2.4. Tumorgenezis

A daganat keletkezésének és növekedésének okait elsősorban a genetikai állomány szerkezetében és funkciójában bekövetkező változásokban kell keresnünk. Ezek a változások érinthetnek kromoszómákat, kromoszómaszakaszokat, egyes géneket, a génekhez tartozó regulációs szekvenciákat, vagy éppen a gének működését befolyásoló szignalizációs útvonalakat. A genomban kialakuló hibák következtében „károsodhatnak” a sejtekben a sejtosztódást, az apoptózist, vagy a sejtek genomját javító mechanizmusait szabályozó genetikai regulációs mechanizmusok (31, 32, 33).

Slaughter és munkatársai „field cancerization” elmélete szerint a tumorigenezis egy többlépcsős folyamat, külső karcinogén hatásra sejt működési zavar lép fel. Ezt a modellt alapul véve a cholesteatoma esetén extrinsic faktor lehet a humán papillomavírus (HPV16) fertőzés, illetve a cholesteatomára jellemző krónikus gyulladás is. A többlépcsős folyamat következtében számos protoonkogén expressziójának, aktivitásának megváltozása és a tumorszupresszor gének inaktivációja figyelhető meg, így a sejtciklus regulációja több ponton is károsodik. Ezen hatások következtében tumor kialakulásához vezető genetikai eltérések jöhetnek létre. Nyilvánvalóan szoros összefüggés van a genetikai aberrációk létrejötté, típusai és a klinikai malignitás között (11, 15, 34, 35, 36).

A tumorokban felismert genetikai abnormalitásokat azok típusától függően különböző molekuláris biológiai módszerekkel lehet azonosítani. Ilyenek pl. a konvencionális citogenetikai, molekuláris citogenetikai (fluoreszcencia in situ hibridizáció, FISH), áramlási citometriai és molekuláris genetikai (pl. szekvenálás, high-throughput genotipizálás, proteomikai módszerek) vizsgálati módszerek (37).

A cholesteatoma invazivitása és agresszív viselkedésének magyarázatára számos kutató keresett genetikai magyarázatot. Egy érdekes és vitatott elképzelés, hogy a cholesteatoma egy alacsony grádusú neoplasztikus elváltozásnak tekinthető, ezért egyre több molekuláris szintű kutatási eredmény megkérdőjelezi a jóindulatú tumor helyénvalóságát és a cholesteatomát inkább egy alacsony grádusú neoplasztikus elváltozásnak tekinti (38).

Ismert, hogy a felnőttkori cholesteatomákkal szemben a gyermekkori cholesteatomák sokkal agresszívebb viselkedésűek, hajlamosabbak a recidíva tumor kialakulására. E jelenségek magyarázatára nem elegendő az anatómiai-mikrokörnyezeti különbségeket feltételezni. A cholesteatoma gyermek és felnőttkori esetei viszont jó modellrendszert képeznek a hasonló szövettani szerkezetű, de eltérő biológiai viselkedést mutató daganatokban az invazívabb, progresszívebb fenotípust kialakító molekuláris elváltozások tanulmányozására (7, 18).

2.5. Genetikai rendellenességek cholesteatomában

Az irodalmi adatok alapján nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy családi halmozódás jellemezné a cholesteatomát. Nem mutattak ki egyértelmű genomiális instabilitást sem cholesteatomában, viszont néhány közleményben leírtak aneusomiát, immunhisztokémiai vizsgálatokkal pedig fehérje expressziós különbségeket (c-MYC, TP53 fehérjék). Két,

nemrégén közölt „high throughput” microarray és proteomikai módszereket alkalmazó kísérletben többszáz eltérően expresszálódó gént azonosítottak cholesteatoma mintákban.

2.5.1. Kromoszómális eltérések vizsgálata

2.5.1.1. Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH) vizsgálatok

Míg régebben a daganat háttérében álló kromoszóma eltérések vizsgálata a klasszikus citogenetikai módszerekre korlátozódott, a 90-es évek elején megjelentek az új nagyfelbontású módszerek, melyekkel lehetségessé vált a kromoszómális eltérések pontos kimutatása (39).

A FISH vizsgálómódszer segítségével számos kutatócsoport talált kromoszóma rendellenességeket a cholesteatomában. Yildirim és munkatársai recidiváló és nem recidiváló cholesteatomákban vizsgálták a 8-as kromoszómát. Kísérleteik eredményei azt mutatták, hogy mind a két csoportban találhatóak 8. kromoszóma számbeli rendellenességeit mutató aneuploid sejtek, amelyek magasabb százalékban fordultak elő a recidiváló esetekben (38).

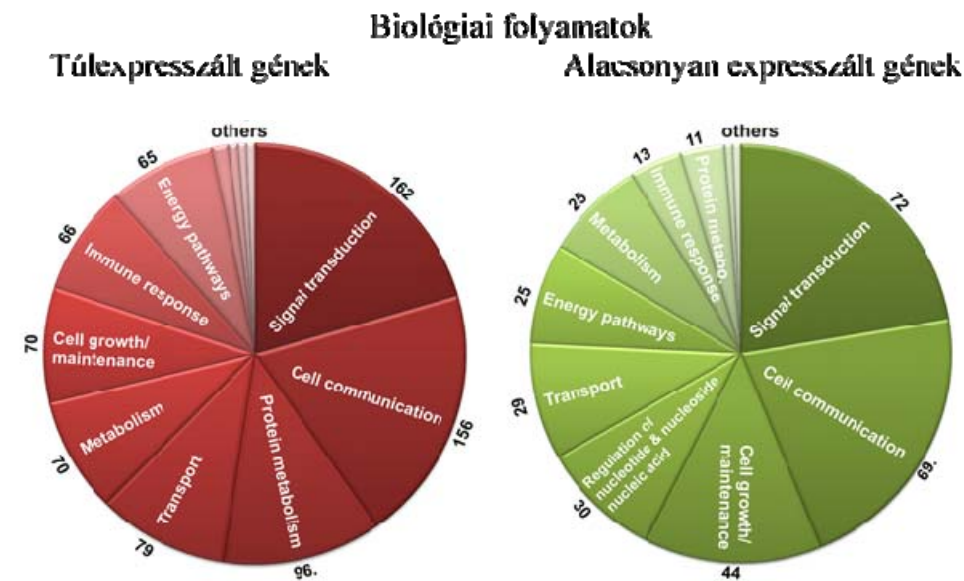
Lavezzi és munkatársai 44 cholesteatomás esetet vizsgálva detektáltak a 7-es kromoszóma esetében a számbeli eltérést. (40). Ecsedi tanulmányában 16 cholesteatoma mintát vizsgált 7-es, 8-as, 17-es kromoszómák centromer régiójára specifikus DNS próbák használatával. Megállapította, hogy a vizsgált kromoszómákra az aneuszómiás sejtek aránya nagyobb százaléku volt a csontot errodáló cholesteatomáknál, mint a csontot nem errodálóknál (41).

2.5.1.2. A cholesteatoma genetikai hátterének vizsgálata nagy teljesítményű molekuláris módszerekkel

Az 1996-ben bevezetett nagyteljesítményű DNS microarray (chip) módszer nagyságrendekkel emelte meg az egyidejűleg vizsgálható gének számát, lehetővé váltak a teljes genomot lefedő génexpressziós vizsgálatok. A microarray technológia alkalmas nagyobb genomi eltérések vizsgálatára is. Ma már fehérje alapú chipek is rendelkezésre állnak, tehát a proteomikai vizsgálatokban is használhatóak nagy teljesítőképességű, összehasonlító elemzésekre is alkalmas molekuláris biológiai módszerek (42, 43).

Ezen molekuláris genetikai, citogenetikai, proteomikai módszerek felhasználásával cholesteatoma mintákban is végeztek teljes genomméretű gén expressziós és fehérje mintázat analízist, melyek segítségével nagyobb rálátásunk lett ennek a betegségnek a hátterében álló biológiai eltérésekre.

Klenke és munkatársai DNS microarray vizsgálattal a cholesteatomában a tumorokhoz nagyon hasonló gén expressziós mintázatot detektáltak. Számos megváltozott expressziójú tumor-releváns gént, inflammatorikus folyamatban szerepet játszó mediátort, interleukint és ciotkint, fehérje degradáló és tumorgenezissel kapcsolatos gént azonosítottak (pl.: LCN2, MMP1, MMP9, MMP10, MMP12, BCL2L1, CEACAM6, S100A7, S100A9, PAX, SERPINB3, SERPINB4, KRT6 A/B, KRT18, KRT19, KRT8) (42). A 3. ábrán láthatóak azok a biológiai folyamatok, amelyekben a cholesteatoma mintákban emelkedett vagy alacsonyabb expressziót mutató gének vesznek részt.



3. Ábra. Cholesteatomában aberráns expressziót mutató gének által befolyásolt biológiai folyamatok. A leggyakrabban érintett folyamatok: szignáltranszdukció, sejt-sejt kölcsönhatás, fehérje anyagcsere, sejtnövekedés, transzport, anyagcsere, immunválasz, energia termelő folyamatok, genom karbantartás. (Klenke et al. PLOS One, 2012.)

Széleskörű proteomikai és citogenetikai vizsgálatokat végzett Britze és munkacsoportja. Munkájuk során retroauricularis bőrből, dobhártya részletből, cholesteatomából, a cholesteatoma nyakából és a középfül nyálkahártyájából származó mintákat analízálták. 295 olyan megváltozott expressziójú fehérjét detektáltak, melyek feltételezhetően felelősek lehetnek a cholesteatoma kialakulásáért (néhány példa: STS, CEACAM6, PRTN3, ELANE, MPO, MMP9, HTRA1, S100A7, S100A16/18, S100A7A, S100A12, S100A7, S100A8, S100A9, COL18A1, NID2, KRT4, KRT 7/8/19, PFN2). Számos olyan extracellularis mátrix- és bazális membrán fehérje eltérő expresszióját mutatták ki cholesteatomában, melyek expressziós mintázata tumorszerű alterációkéhoz hasonló. Az S100 csoportba tartozó fehérjék gyulladást erősítő hatása is ismert. Ezekkel az eltérésekkel magyarázható a cholesteatomás megbetegedés jellegzetes fenotípusa (43).

2.6. A cholesteatoma és az apoptózis

2.6.1. Sejt proliferáció és az apoptózis

A sejt proliferáció és apoptózis folyamatainak egyensúlya fontos szereppel bír a tumorok kialakulásában. A daganatok keletkezésében vagy a proapoptotikus aktivitás hiánya, vagy az anti-apoptotikus hatás fokozódása játszik szerepet. Ezek zömmel génexpresszió-változások következményei, de egyes regulátor fehérjék aktivitásának változása is fontos tényező lehet.

Chung és munkatársai cholesteatomában vizsgálták az apoptotikus és az anti-apoptotikus folyamatokat és azt találták, hogy cholesteatomában az apoptózis és az osztódás egyensúlya megváltozik, a proliferációs folyamatok dominálnak (44).

Miyao és munkatársai a kaszpáz-3, a kaszpáz-8, a nuclear factor kappa B (NF- κ B) szinteket és az apoptózis mértékét hasonlították össze 41 cholesteatoma és 13 kontroll retroauricularis bőr mintában. Tanulmányukban megállapították, hogy a cholesteatomában a kaszpázok fokozott aktivitása és megemelkedett apoptotikus aktivitás észlelhető. Ez utóbbi folyamattal magyarázták a cholesteatoma jellegzetes tulajdonságaként a keratin törmelék felhalmozódását. Érdekes módon az anti-apoptotikus NF- κ B kimutatható volt a cholesteatoma epitéliumában, de inaktív állapotban (45).

Olszewska és munkatársai hasonló kísérleti rendszerben 29 másodlagosan szerzett cholesteatomában vizsgálták az apoptotikus aktivitást. A kontrollként használt retroauricularis bőr minták epidermális granuláris rétegében találták a legmagasabb apoptotikus aktivitást (28.5%-ban apoptotikus sejtek). A cholesteatoma epitéliumban szignifikánsan nagyobb

százalékban voltak kimutathatóak az apoptotikus sejtek a spinózus és granuláris rétegekben, a bazális rétegben viszont nem voltak jelen ilyen sejtek (46).

Ergün és munkatársai a cholesteatoma és a fül laphámsejtes karcinóma összehasonlításakor a cholesteatomában találtak nagyarányú apoptózist és proliferációt, a karcinómára viszont csak a sejproliferáció volt jellemző (47).

Mallet és munkatársai 91 felnőtt és gyermekkori cholesteatoma vizsgálatával megállapították, hogy a cholesteatoma kiterjedése, recidíva hajlama, és a magas proliferációs index között összefüggés van, illetve a gyermekkori cholesteatomákban nagyobb a proliferációs index, mint a felnőttkorban (48).

2.6.2. Humán papillomavírus fertőzés cholesteatomában

A humán papillomavírus (HPV) egy közismerten onkogén hatású vírus, számos fejnyaki tumorban is detektálható. Ferekidis és munkatársai 29 cholesteatomában vizsgálták az epitélium hiperpláziáját, és HPV fertőzés következményeként kialakuló koilocitózis jelenségét. A szerzők szignifikáns összefüggést találtak a papilláris hiperplázia, a koilocitózis és a cholesteatoma agresszivitása között. 14 cholesteatoma mintát agresszív és nem agresszív csoportokra sorolták (N=7 mindkét csoportban). A 7 agresszív cholesteatomából 3-ban sikerült kimutatniuk a HPV jelenlétét (36). A vírusfertőzés kiváltotta interferon termelés apoptózist indukálhat, a vírusfertőzés is befolyásolhatja a cholesteatoma apoptotikus aktivitását.

Az irodalomban közölt adatok összefoglalásaként megállapítható, hogy a cholesteatoma növekedését két ellentétes folyamat – a keratinociták osztódása és az apoptózisuk – egyensúlyának megbomlása eredményezi. A normál bőr értékeihez hasonlítva mind a

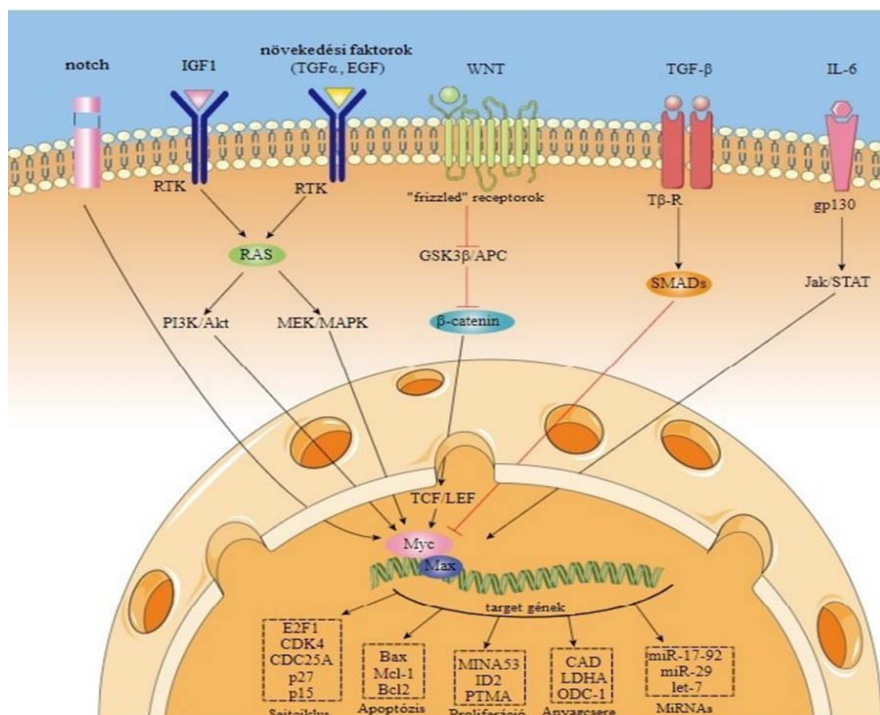
proliferatív, mind az apoptotikus index magasabb cholesteatomában (43). Feltételezhetően a keratinociták osztódását nem tudja ellensúlyozni az apoptózis folyamata.

2.7. Az általunk vizsgált gének jellemzése és feltételezett szerepük a cholesteatomában

A daganatkialakulás szükségszerűen megváltoztatja a protoonkogének és tumorszupresszor gének aktivitását. A kísérleteinkhez általunk kiválasztott gének közül három, a MYC, a TP53 és az MMP9 kulcsfontosságú géneknek tekinthetők a fej-nyaki laphám eredetű daganatok kialakulásában. Ennek ismeretében feltételeztük, hogy ennek a három génnek a vizsgálata segítheti a cholesteatoma háttérében álló patomechanizmusok megértését.

2.7.1. A MYC géncsalád, a c-MYC szerkezete és funkciója

A MYC géncsaládba három nagyon hasonló protoonkogén tartozik, a c-MYC, n-MYC és az l-MYC. A MYC gének által kódolt fehérjék transzkripciós faktorok, a sejtosztódást, a sejt immortalizációt, a dedifferenciálódást és az anyagcsere folyamatait szabályozzák. A 4. ábra a c-MYC-re ható szignalizációs útvonalakat és a legfontosabb target géneket ábrázolja.



4. Ábra. A c-MYC szignalizációs útvonala. A c-MYC fehérje transzkripciós aktivációs doménnel rendelkező DNS-kötő transzkripciós faktor ami számos, a sejtosztódás, sejtciklus, apoptózis és anyagcsere szabályozásában fontos szerepet játszó gén átírását szabályozza. A MYC-Max heterodimer a TFIID fehérjével kölcsönhatva a transzkripció elongációját is befolyásolja. (www.creative-diagnostics.com)

A c-MYC a 8. kromoszómán található transzkripciós faktort kódoló protoonkogén. Terméke egy 439 aminosavból felépülő 62 kDa-os sejtmagban található fehérje (a p62 c-MYC). A natív c-MYC fehérje bHLHLZ (bázikus régió/helix-loop-helix/leucine zipper) domén stuktúrájú transzkripciós aktivációs doménnel rendelkező DNS-kötő transzkripciós faktor. A c-MYC a MAX fehérjével heterodimereket alkotva a DNS-ben a 5'-CANNTG-3' enhancer-box szekvenciához kötődve a célgének transzkripcióját szabályozza. A c-MYC a sejtosztódás folyamatának mester regulátora, számos pro-proliferatív gén expresszióját koordinálja, résztvesz a sejtciklus szabályozásában, elősegíti a sejtek szaporodását, de befolyása van a metabolizmusra és az apoptózisra is. Számos tumorban megfigyelhető

emelkedett expressziója, így például lymphomákban, a vese - és tüdő daganatban, a vastagbél tumorokban, a melanomában, expressziós szintje prognosztikai jelleggel bír. Amennyiben DNS károsodással jár, genomikai instabilitást okoz, ezzel hozzájárul a tumorigenezishez (49, 50, 51, 52, 53). Mivel megfelelő mennyiségű túlélési faktor hiányában, normál sejtekben a c-MYC apoptózist indukál, a c-MYC megemelkedett expressziója gyakran szelekciós előnyt biztosít egy második, tumorszupresszor funkciót ellátó gén mutációjának (pl. TP53), ami eliminálhatja az apoptózis aktiválódását (50).

2.7.1.1. A c-MYC és a cholesteatoma

Számos tanulmány mutott ki kromoszóma-rendellenességeket cholesteatomában, az aberrációk következtében a sejtciklus szabályozásában résztvevő faktorok, például a tumorszupresszor gének vagy a protoonkogének hibásan működhetnek (39, 40, 41). Ozturk és munkatársai kimutatták a 8-as kromoszóma aneuploiditását és a c-MYC gén kópiaszámbeli variánsát cholesteatomában (54). A megnövekedett c-MYC fehérje szintjét immunhisztokémiai módszerekkel is kimutatták cholesteatomában (55).

2.7.2. TP53 gén

A tumorszupresszor TP53 gén a 17-es kromoszóma rövid karján található, 393 aminosavból álló fehérjét kódol. A p53 fehérje résztvesz a sejtciklus szabályozásban, súlyos DNS károsodás esetén repair géneket aktiválhat és képes gátolni a G₁/S átmenetet, valamint apoptózist is kiválthat. A p53 fehérje minden szövetben kifejeződik alacsony szinten. Alap állapotában az ubikuitin-ligáz MDM-2 fehérjéhez kötve inaktív állapotban van. Az MDM-2

fehérje ubiquitinálja a p53-at, ami a fehérjének a proteozómában történő degradációjához vezet, csökkentve a p53 fehérje szintet a sejtmagban.

A DNS-ben jelenlévő mutációk hatására az ATM/CHEK1/CHEK2 szignalizációs útvonal aktiválódása következtében a p53 foszforilálódik. A foszforilált p53 nem kötődik az MDM-2-höz, ezáltal degradációja lelassul és szabad, aktív p53 halmozódik fel a sejtben. A p53 aktiválja a p21 gén expresszióját, a keletkező p21 fehérje gátolja a ciklin-CDK komplexet és blokkolja a sejtciklus továbbhaladását. Nagymértékű DNS károsodás esetén a p53 fehérje aktiválja a DNS hibajavító enzimrendszerét. Amennyiben a DNS károsodás túl nagy, akkor a p53 indukálja a sejthalálért felelős géneket, ami elindítja a károsodott sejtek eliminációját (50, 56, 57).

2.7.2.1. A TP53 és a cholesteatoma

A cholesteatomában megfigyelhető kontrollálatlan sejtproliferáció okát keresve Albino és munkatársai 41 cholesteatoma, 8 postauricularis bőr és 7 dobhártya mintában vizsgálták a p53 protein eloszlását. A normál bőrben és a dobhártyában a p53 főleg a bazális, néhány esetben a spinózus rétegben volt kimutatható. A cholesteatomákban az epidermisz minden rétegében detektáltak p53 pozitivitást, a legmagasabb érték a bazális rétegben volt kimutatható (58). A cholesteatomák – a bőrtumorokhoz hasonlóan – magas proliferatív aktivitást mutattak, amelyet a szerzők a p53 tumorszupresszor gén feltételezhető károsodására vezették vissza. A p53 funkció meghibásodása hatással lehet a keratinocita proliferációra, az apoptózisra, a sejtciklus szabályozására, a keratinociták differenciálódására és neoplasztikus transzformációjára. Fontos megjegyezni, hogy a c-MYC is részt vesz a TP53 gén transzkripciójának szabályozásában (50).

2.7.3. Citokeratinok

A citokeratinok az epiteliális sejtek sejtvezének felépítésében résztvevő intermedier filamentumok fő komponensei. Jelenleg több mint 20 különböző citokeratin fehérjét ismerünk, amelyek két csoportra oszthatóak: a savas, vagyis az I típusú - és a bázikus vagy semleges II típusú citokeratinokra.

A citokeratinok gyakran használt markerek az onkológiai diagnosztikában, mintázatuk tumor specifikus, eloszlásuk jelzi az adott szövet sejtjeinek az aktivitását, proliferációját, migrációját, differenciáltsági állapotát. Például a klinikai gyakorlatban is használt egyik biomarker a szöveti polipeptid antigén (TPA), a detektálására alkalmazott antitestek tulajdonképpen a 8-, 18-, és 19-es citokeratin fehérjéket ismerik fel. A TPA egy proliferációs marker, mely szinte bármely daganat esetében használható, de fokozott proliferációval járó benignus állapotokban is emelkedett lehet a szintje (59). A citokeratinok prognosztikai faktorként is hasznosak, a mintázatuk, az eloszlásuk pontosan megjósolhatja a betegség stádiumát (60, 61).

Miután a cholesteatomától eltérően az egészséges bőrben az epiteliális differenciálódási és proliferációs folyamatok jól kiegyensúlyozottak, ezért a cholesteatoma és a normál bőrminták között a citokeratinokat kódoló gének expressziójában megfigyelhető különbségek segíthetnek a cholesteatoma sejtjeinek differenciálódási és proliferációs állapotának felderítésében, jellemzésében.

2.7.3.1. Citokeratin 1 és 10

Ez a két fehérje együtt kerül expresszióra annak ellenére, hogy génjeik nem azonos kromoszómán helyezkednek el (a citokeratin 1 génje a KRT1 a 12-es kromoszóma q13.13

régiójában található, a citokeratin 10 génje pedig a KRT10 a 17-es kromoszóma q21.2 régiójában kódolt), ugyanis a két fehérje heteroduplexet alkot. A citokeratin 1/10 az epidermisz suprabazális rétegében helyezkedik el, elszarusodási, differenciációs marker szereppel bír. A citokeratin1/10 magasabb arányú expressziója figyelhető meg a jól differenciált, jobb prognózisú fej-nyaki tumorokban, ahol alacsonyabb a hypoxia és a sejtciklus diszfunkciójának mértéke (62, 63, 64).

2.7.3.2. Citokeratin 19

A KRT19 gén a 17 kromoszóma q21.2 régiójában található. A legújabb kutatási eredmények szerint a citokeratin 19 fehérje tumorszupresszor szerepet tölt be a sejtekben. Az AKT kinázra hatva, a NUMB függő NOTCH szignalizációs útvonalon keresztül befolyásolja a sejtciklus állapotát, ezzel a proliferációt gátolja normál sejtekben. A citokeratin 19 expressziójának csökkenése ennek megfelelően megnövekedett sejtproliferációval, migrációval, invázióval és sejttúléléssel jár (65).

Abbas és munkatársai a citokeratin 19 aberráns expresszióját mutatták ki szájüregi és a bőr laphám daganatában (63, 66, 67). Crowe és munkatársai a fej-nyaki daganatokban megnövekedett citokeratin 19 expresszió esetében kisebb invazivitási potenciált mértek (68).

2.7.3.3. A cholesteatoma és a citokeratinok

Több kutatócsoport is vizsgálta a citokeratin mintázatot cholesteatoma mintákban. Van Blitterswijk és munkatársai immunhisztokémiai vizsgáló eljárással a középfül epitélium, a cholesteatoma és a hallójárat bőrcitokeratin mintázatát tanulmányozták. A hallójárat bőrcitokeratin és a cholesteatomában domináns volt a citokeratin 10 jelenléte, mellyel a cholesteatoma

epidermalis jellege igazolódott, de a citokeratin 4, 18, 19 expressziója elenyésző volt, ennek emelkedett szintje inkább a középfül epitéliumára volt jellemző (69).

Olszewska több tanulmányt is készített a cholesteatoma citokeratin mintázatáról. Eredményeik szerint, a cholesteatoma keratin mintázata jól korrelál a sejtek differenciáltsági állapotával, a citokeratin 10 a magasabban differenciált keratinocitákra, míg a citokeratin 4 az alacsonyabb differenciációs stádiumban lévő sejtekre jellemző. Szintén Olszewska és munkatársai citokeratin 10,14,18,19,34 fehérjét vizsgálták gyermek- és felnőttkori cholesteatomában. A citokeratin mintázat mindkét csoportban azonos volt, amiből arra következtettek, hogy a kialakult cholesteatomák eredete azonos. A citokeratin 10-et proliferatív aktivitással hozták összefüggésbe (62, 70).

Min és munkatársai az involucrin, filaggrin és a citokeratin 4, 10, és 16 molekulák mintázatát vizsgálták cholesteatomában. Eredményeik szerint a citokeratin 4 csak a bazális rétegben, míg a citokeratin 10 a suprabazális rétegben található meg. Tanulmányuk szerint a suprabazális rétegben bekövetkező korai, módosult differenciációs folyamat vezethet egy megváltozott keratinocita éréshez, ami magyarázhatja a cholesteatomára jellemző proliferációs folyamatot, hiperkeratózist (71).

Cholesteatoma minták felhasználásával végzett microarray génexpressziós vizsgálatok több citokeratin gén megváltozott expresszióját is igazolták, így a KRT19, KRT18, KRT5, KRT6 és KRT14 génekét. Hasonló eredményeket már korábbi, eltérő módszereket alkalmazó tanulmányokban is közöltek (42). Szájüregi carcinomában szenvedő páciensekkel végzett kutatás szerint a citokeratin 19 fontos prognosztikai tényező a tumor recidiválásra vonatkozóan (72).

2.7.4. MMP géncsalád tagjai

Az extracelluláris mátrix (ECM) egy dinamikus struktúra, melyet a folyamatos átalakulás jellemez („remodelling”). Átalakításában mind fiziológias, mind kóros állapotokban kulcsszerepe van az MMP-TIMP enzim rendszernek. A mátrix metalloproteázok (MMP-k) segítségével az ECM strukturális átalakítása indul meg a gyulladásos folyamatokban. Legújabb tanulmányok szerint a citokinek és növekedési faktorok is mobilizálódnak és aktiválódnak MMP-k hatására, ezért az MMP-TIMP rendszernek szerepe van az immunválasz felerősítésében és finomhangolásában is (73, 74). Az MMP-k strukturálisan hasonló, de eltérő gének által kódolt cink - és kalciumfüggő endopeptidáz enzimek, az ECM molekuláinak teljes spektrumát képesek bontani. A gerincesek MMP-ai a domén szerkezet, az elhelyezkedés és a szubsztrát specificitás alapján tradicionálisan hat csoportba sorolhatók: (1) az intersticiális kollagént bontó kollagenázok (MMP-1,-8 és -13); (2) a denaturált kollagént (zselatin) bontó zselatinázok (MMP-2 és -9); (3) az ECM-et bontó és más MMP-ket aktiváló sztromelizinek (MMP-3, -10 és -11); (4) a sejtfelszíni molekulákat és az ECM-et bontó matrilizinek (MMP-7 és -26); (5) a membrán típusú MMP-k (MMP-14, -15, -16, -17, -24 és -25), és (6) az egyéb csoportba tartozók (75, 76).

2.7.4.1. MMP9 és a cholesteatoma

Juhász és munkatársai immunhisztokémiai festéssel vizsgálták cholesteatomában az MMP9 expresszióját. Tanulmányukban leírták, hogy a cholesteatomában magasabb volt az MMP9 szintje normál bőrhöz viszonyítva. Klinikai adatok alapján azt feltételezték, hogy a cholesteatomában az MMP9 emelkedett termelődése a csontdestrukcióval hozható

összefüggésbe. Az MMP9 expressziója azokban az esetekben volt emelkedett, ahol a gyulladási folyamat intenzívebb volt (77). Lin és munkatársai az MMP2, MMP9 gének expresszióját vizsgálták. Eredményeik szerint is a csontdestrukció és az inflammatorikus folyamat jól korrelál egymással, illetve a mátrix metalloproteináz expresszióval (78).

III. Célkitűzések

Munkám során céлом volt a cholesteatoma kialakulásának háttérben álló genetikai faktorok vizsgálata.

1. A c-MYC protoonkogén expressziós szintjének mérése egészséges, retroaurikuláris régióból származó bőr mintákban, illetve a cholesteatoma és atheroma (kásadaganat) mátrixából származó műtéti mintákban. A mért értékek összehasonlítása annak eldöntésére, hogy különbözik-e a c-MYC expresszió a kontroll és betegminták között, valamint van-e expressziós különbség a két hisztológiailag hasonló epidemalis ciszta között.

2. A gyermek és felnőttkori beteg csoportot recidiva hajlam alapján tovább bontva a cholesteatoma műtéti mintákban mért c-MYC expressziós szinteket összehasonlítani annak érdekében, hogy kapcsolatot találjunk a recidíva és a c-MYC expressziós szintje között.

3. Három citokeratin gén expressziós mintázatának meghatározása az életkor és recidíva hajlam alapján felbontott betegcsoportokban, a citokeratin génexpressziós mintázatok összehasonlító analízise, esetlegesen a prognosztikai szempontból fontos citokeratin azonosítása.

4. A cholesteatoma agresszivitásában feltehetőleg szerepet játszó proteáz, az MMP9 expressziós szintjének összevetése a kontrollként használt normál bőr és a cholesteatomás betegcsoportok mintáiban.

5. A sejtciklus szabályozásában fontos tumorszupresszor gén, a TP53 expressziójának analízise cholesteatomában.
6. Egy, a vizsgálatok során recidiváló beteg első és második mintájában az összes vizsgált gén expressziós szintjének összevetése a recidivában feltehetően szerepet játszó gén azonosítása miatt.

IV. Anyagok és módszerek

4.1 Mintagyűjtés

Vizsgálataink tervezetét a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (protokollszám: 3047–2009). A műtéti minták kutatási célra történő tervezett felhasználásáról minden beteget megfelelően tájékoztattunk, a minták felhasználására a vizsgálatokba bevont személyek írásbeli beleegyezését követően került sor. A fiatalokú betegek esetében a gyermekek szülei írtak alá a beleegyező nyilatkozatot, hozzájárulván a minták felhasználásához. A vizsgálatokat a Helsinki Egyezmény (1964) elvei szerint végeztük. Vizsgálatainkban 26 cholesteatomás beteget -11 nő és 15 férfi – és 15 atheromás beteget vontunk be. A cholesteatomás betegek életkora 4 és 65 év között változott (átlagéletkor: 23,4 év). Valamennyi beteg dobhártyája perforált volt, és egy vagy több középfül műtéten estek át. A cholesteatomás betegeket két csoportra osztottuk az életkor szerint: gyerekek (15 eset; 0–18 év) és felnőttek (11 eset; 19 évtől) csoportjaira. Minden cholesteatoma és atheroma esetén a diagnózist hisztopatológiai vizsgálat igazolta. A betegek demográfiai és klinikai adatait, korukat, nemüket és a cholesteatoma sebészeti paramétereit az 1. és 2. táblázatban foglaltuk össze (Eredmények fejezet). A 26 cholesteatoma minta mellett 5 kontroll bőrmintát is gyűjtöttünk egészséges egyének retroauriculáris területéről. A kontroll csoportot alkotó egyéneknek ép volt a hallása, daganatos betegségük nem volt, fülkagyló korrekciós beavatkozáson estek át (átlagéletkor:34,6).

4.2. Molekuláris genetikai módszerek

4.2.1. A teljes RNS készlet izolálása műtéti mintákból

A műtétek során eltávolított sebészeti mintákat *RNAlater*TM (Thermo Fischer Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) RNS stabilizációs reagensben konzerváltuk, tipikusan 50 μ L *RNAlater*TM oldat/mg szövet arányban. Az így fixált cholesteatoma, atheroma és kontroll normál bőr mintákat 4°C-on tároltuk a teljes RNS mennyiség kinyeréséig. A cholesteatoma és az atheroma minták mátrixát a környező szövetektől manuálisan megtisztítottuk, ezt követően átlagosan 40 mg-nyi szövetmintát vágunk vékony csíkokra, majd az *RNAlater*TM oldat eltávolítása után TRI reagensben homogenizáltuk teflon dugattyús szövethomogenizáló (Molecular Research Center INC Cincinnati, USA) segítségével. A szövet homogenizátum felszínéről eltávolítottuk a zsírréteget és a maradék mintát használtuk RNS izolálásra. A teljes RNS kinyerését a homogenizált mintákból Ribo-Pure kit (Ambion LTD., Huntingdon, Egyesült Királyság) felhasználásával végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS koncentrációját, minőségét és integritását NanoDropTM 1000A (Thermo Fisher Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) spektrofotométer segítségével ellenőriztük. A kinyert RNS mennyisége átlagosan 0,4 μ g/ μ L volt, tisztasági indexe pedig minden minta esetében 1,85 felett volt (260/280 és 260/230 hányadosok alapján).

4.2.2 Az izolált RNS molekulák átírása cDNS-é.

Az egyszálas cDNS előállításához mintánként 2 µg RNS-t használtunk templátként. A reakció végtérfogata 20 µL volt, a reverz transzkripcióhoz High Capacity cDNA Kit with RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) kitet használtunk. A reakciót a gyártó által megadott protokollt követve végeztük el, röviden: 2 µL 10× RT puffer, 0,8 µL 25× dNTP Mix (100 mM), 2 µL 10× RT random primerek, 1 µL MultiScribe™ reverz transzkriptáz és 1 µL RNase inhibitor összemérésével elkészítettük a „master mixet” amit kiegészítettünk 2 µg össz RNS-el és nukleáz-mentes vízzel 20 µL-re. A reakció keveréket előbb 10 percig 25°C-on -, majd 120 percig 37°C-on inkubáltuk. A reakció befejezéseként az elegyet 5 percig 85°C-on inkubáltuk, majd azonnal jégre téve 0°C-on tartottuk a további felhasználásig.

4.2.3. Real-time (valós idejű) qPCR reakció

A célgénekről átíródott mRNS molekulák mennyiségét TaqMan alapú, kvantitatív real-time (valós idejű) PCR (qPCR) mérésekkel határoztuk meg. A géntermékek mennyiségnek megbízható, pontos mérésére a gyártó (Applied Biosystems, Foster City, CA, Egyesült Államok) által tervezett és optimalizált génspecifikus primereket és próbát tartalmazó Assays-on-Demand™ Gene Expression Products termékeket használtunk. Az általunk felhasznált génspecifikus Assays-On Demand azonosítók a következők voltak: TP53 gén: Hs00153408_m1; KRT1 gén: Hs00196158_m1; KRT10 gén: Hs00166289_m1; KRT19 gén: Hs00761767_m1; MMP9 gén: Hs00957562_m1. A qPCR mérések kivitelezésére ABI Prism

7900HT (Thermo Fisher Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) thermal cycler készüléket használtuk fel. A reakció elegy összetétele a következő volt: 10 μ L AmpliTaq Gold DNS Polimeráz tartalmú TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2 \times) (Thermo Fisher Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) 4 ng cDNS és a génspecifikus Assay-on-Demand TaqMan génexpressziós próbák és primerek 20 μ L végtérfogatban. Az amplifikációs reakció egy ciklusának hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: kezdeti denaturáció, 15 másodperc 95°C-on; a hibridizációs lépés: 60 másodperc 60°C-on; polimerizáció/elongáció 30 másodperc 72°C-on. Az amplifikáció 40 ciklusból állt. A mérések során a génexpresszió normalizálásához a PPIA gént használtuk belső referencia (háztartási) génként (Assays-On Demand azonosító: Hs99999904_m1), a génexpresszió mértékét a ΔC_T érték számításával határoztuk meg.

4.2.4. Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai elemzését a GraphPad Prism 5.0 szoftver segítségével (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) végeztük el. Valamennyi adatsorra kiszámoltuk a leíró statisztikai értékeket (átlag, standard szórás, standard hiba). Az adatok eloszlását Kolmogorov-Szmirnov teszt segítségével elemeztük. Az egyes betegcsoportok esetében a génexpresszióban jelentkező különbségek statisztikailag szignifikáns voltát az egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) nem-parametrikus változatának felhasználásával, a Kruskal–Wallis tesztel (K-W teszt) és a post hoc Dunn teszttel vizsgáltuk. Páronkénti összehasonlítások esetében a Mann-Whitney tesztet használtuk a különbségek szignifikáns voltának meghatározására. Valamennyi teszt esetében szignifikancia szint $p < 0,05$ volt. Az ábrákon a Dunn teszt p értékeinek jelzésére a következő szimbólumokat használtuk: * $p <$

0,05; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$. Egy adott gén hatásának nagyságát a Cohen-féle d értékkel jellemeztük.

V. Eredmények

5.1. Klinikai jellemzők

1. Munkánk során 26 műtéti úton eltávolított szerzett cholesteatoma mintában mértük a kiválasztott gének expressziójának mértékét, kontrollként 5 retroauriculáris régióból származó normál bőrt használva. A c-MYC gén expresszióját 15 atheromából származó mintában is meghatároztuk. A betegeket két csoportra osztottuk életkor szerint: gyerekekre (18 életévnél fiatalabb, $N=15$) és felnőttekre (18 életév feletti, $N=11$). A klinikai adatok alapján mind a két korcsoportot tovább kategorizáltuk szerzett (nem recidiváló, egyszeri) és recidiváló csoportokra (1. Táblázat).

1. Táblázat. A cholesteatomás betegek életkor és recidíva hajlam szerinti csoportosítása.

Kialakulás (életkor)	Gyermekkori (<18)		Felnőttkori (>18)	
N	15		11	
Típus	Egyszeri	Recidív	Egyszeri	Recidív
N	6	9	7	4

A cholesteatoma terjedését vizsgálva klinikai adatokból megállapítható, hogy a nem recidiváló esetekben a kiterjedés kisebb volt, kevesebb régiót érintett, mint a recidiváló esetekben. A recidiváló csoportban több mint két anatómiai régiót érintett a betegség kiterjedése. Klinikai adatok alapján a csontdestrukció mértéke is nagyobb volt a recidiváló esetekben, mint a nem recidiválóban. 26 szerzett cholesteatománál 24 esetben volt jelen

hallócsontláncolati destrukció, 2 esetben volt ép a hallócsontláncolat. A gyermekkori cholesteatomákban nagyobb arányban fordult elő a recidíva, mint felnőttkorban (60% és 36,6%). A betegek demográfiai és műtéti adatait az 2. táblázat tartalmazza. A műtéti leírások alapján a cholesteatoma kiterjedését a középfül régiói alapján atticus (dobüreg felső része, másik nevén epitympanum), antrum, mastoid nomenklatúrát használtunk a destrukciót megmutatva. A felnőtt cholesteatomás betegeknél a dobüreg atticus régiójában lévő cholesteatoma a dobüreg alrégióiba is beterjedt.

2. Táblázat. A cholesteatomás beteg populáció klinikai jellemzői.

Gyermekkori cholesteatoma (n = 15)				Felnőttkori cholesteatoma (n = 11)				Kontroll csoport (n = 5)		
Kor (év)	Nem*	Kiterjedés	Hallócsontok állapota	Kor (év)	Nem*	Kiterjedés	Hallócsontok állapota	Kor (év)	Nem*	Hallócsontok állapota
4	F	Atticus,antrum	Roncsolódott	22	N	Mastoid	Roncsolódott	42	F	Ép
4	F	Atticus	Roncsolódott	25	F	Atticus+antrum	Roncsolódott	50	N	Ép
6	F	Atticus	Roncsolódott	27	N	Atticus,mastoid	Roncsolódott	35	F	Ép
8	F	Atticus	Roncsolódott	31	F	Atticus, mastoid	Roncsolódott	17	N	Ép
8	F	Atticus,antrum	Roncsolódott	32	N	Atticus+antrum	Roncsolódott	29	F	Ép
8	N	Atticus,mastoid	Roncsolódott	34	N	Atticus,mastoid	Roncsolódott			
10	N	Atticus,mastoid	Roncsolódott	42	F	Atticus	Roncsolódott			
11	N	Atticus+mastoid	Roncsolódott	58	N	Atticus+antrum	Roncsolódott			
11	F	Atticus,mastoid	Ép	60	N	Atticus	Roncsolódott			
11	F	Atticus,mastoid	Roncsolódott	62	F	Atticus, mastoid	Roncsolódott			
11	N	Atticus	Roncsolódott	65	F	Atticus,mastoid	Roncsolódott			
12	F	Atticus,mastoid	Roncsolódott							
14	F	Atticus+mastoid	Roncsolódott							
16	N	Atticus,antrum	Ép							
16	F	Atticus,mastoid	Roncsolódott							

*N=Nő, F=Férfi

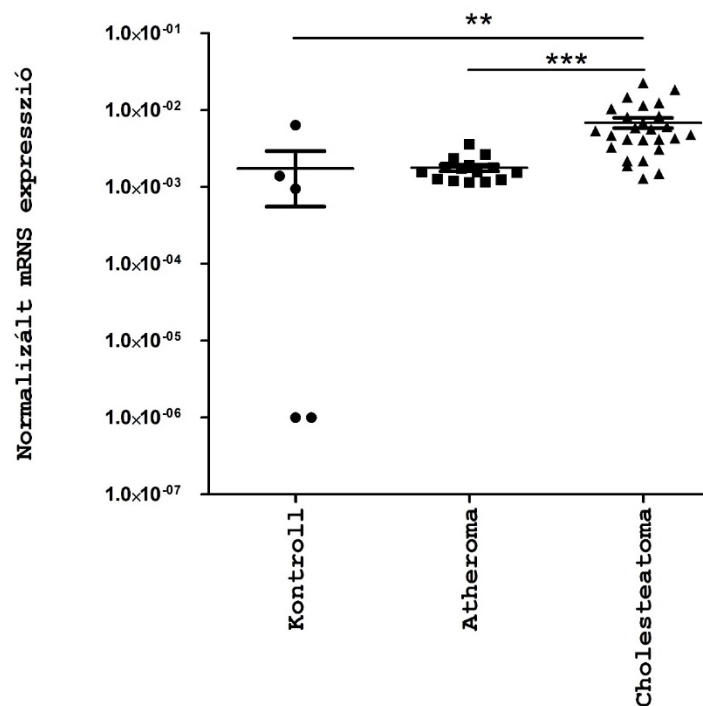
5.2. Gének expressziójának vizsgálata

Munkánk során a sebészetileg eltávolított cholesteatoma és bőr mintákat *RNAlater*[®] oldatban konzerváltuk és 4°C-on tartottuk további feldolgozásig. A szövetmintákat darabolás után mechanikai úton feltártuk, homogenizáltuk és a módszertani részben leírtaknak megfelelően össz RNS-t izoláltunk a homogenizátumokból. Az RNS molekulákat cDNS-é írtuk át és kvantitatív-PCR módszerrel, TaqMan Gene Expression Assays-On Demand kitek felhasználásával mértük az egyes gének expressziós szintjeit. A target gének expressziójának vizsgálatkor a mintákban mért mRNS szinteket a PPIA háztartási gén expressziós értékeinek felhasználásával normalizáltuk. A beteg mintákban mért normalizált mRNS-szinteket a kontrollként használt egészséges, retroauricularis régióból származó bőr mintákban mért expressziós értékekkel vetettük össze.

5.2.1. A c-MYC gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma, atheroma mintákban

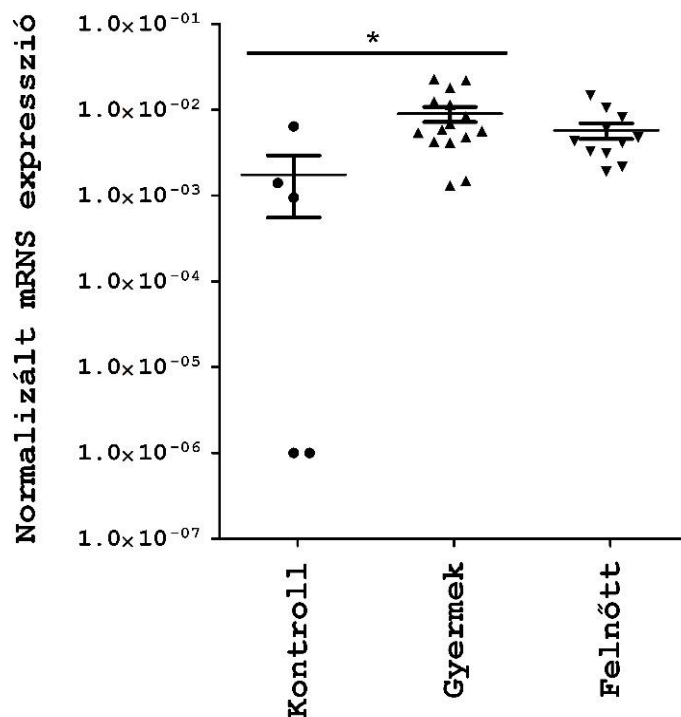
Az utóbbi időben a daganatokkal folytatott vizsgálatokban előtérbe került a c-MYC protoonkogén expressziójának analízise. A c-MYC központi szabályozó szerepet játszik a sejtciklus és az osztódás folyamataiban ezért fontos terápiás target lehet a daganatos megbetegedések kezelésében. A cholesteatomában zajló aktív sejtosztódás és az irodalomban közölt immunhisztokémiai eredmények arra utaltak, hogy érdemes megvizsgálni a c-MYC expressziót cholesteatoma mintákban. A cholesteatoma mellett az ahhoz hasonló szöveti felépítésű, de eltérő viselkedésű cisztában, az atheromában is megmértük a c-MYC expressziót.

Az 5. ábrán bemutatott expressziós értékek mutatják, hogy a c-MYC expresszió minden mintában alacsonynak tekinthető. Nincs szignifikáns különbség a kontroll és a benignus atheroma minták expressziós értékei között (kontroll: átlag (μ) \pm standard deviáció (SD) = $0,0011 \pm 0,001$; atheroma: $\mu \pm SD = 0,0018 \pm 0,0032$; $p = 0,137$). A cholesteatomában mért mRNS expressziós értékek viszont szignifikánsan magasabbak mind a kontroll, mind az atheroma expressziós értékeinél: $\mu \pm SD = 0,007 \pm 0,001$. A kontroll és cholesteatoma értékek esetében a $p = 0,012$, az atheromával történt összehasonlítás esetében $p = 0,0001$ volt.



5. Ábra. A c-MYC gén expressziója cholesteatomában és atheromában. A c-MYC génextpressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr, atheroma és cholesteatoma mintákban. A minták átlagát (μ) és a standard deviáció (\pm SD) értékeit is jelöltük az ábrán. A szignifikancia szintet jelző * értékek: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

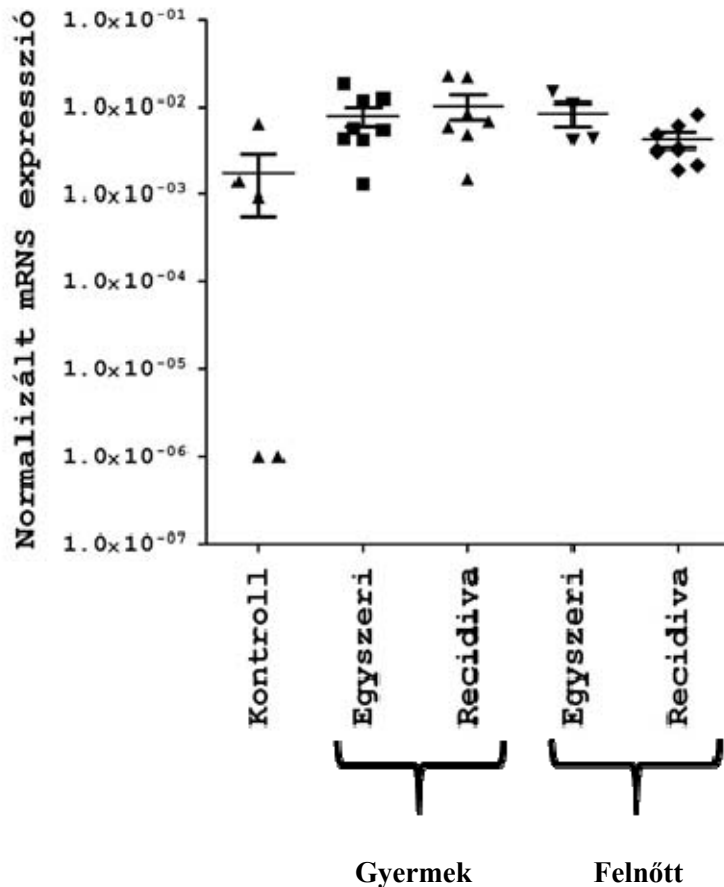
A cholesteatoma betegcsoportot felosztottuk gyermekkori (életkor <18 év) és felnőttkori (életkor >18 év) csoportokra. A 6. ábrán látható, hogy a gyermekkori mintákból mért normalizált expressziós értékek magasabbak, mint a felnőttkori mintákból mért mRNS szintek: gyermekkori minták: $\mu \pm SD = 0,0091 \pm 0,001$; felnőttkori minták: $\mu \pm SD = 0,0063 \pm 0,001$. A többszörös mintavétel korrekciója esetében szignifikáns különbség csak a kontroll és a gyermekkori cholesteatoma értékek között volt, a Dunn p érték: $p = 0,0186$. Ha külön-külön hasonlítjuk össze a két cholesteatoma csoportot a kontroll csoporttal, akkor mindkét cholesteatoma csoport expressziós értékei szignifikánsan magasabbak a kontrollénál, a kontroll-gyermekkori összevetésben $p = 0,0145$, a felnőttkori-kontroll összevetésben $p = 0,031$. A két cholesteatoma csoport között nincs szignifikáns különbség, $p = 0,195$.



6. Ábra. A c-MYC gén expressziós eloszlása gyermek és felnőttkori cholesteatomákban. A cMYC gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr

valamint gyermekkori és felnőttkori cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán. A szignifikancia szintet jelző értékek: * $p < 0,05$.

Az utolsó összehasonlításban mindkét betegcsoportot tovább osztottuk a cholesteatoma előfordulás gyakorisága szerint egyszeri és recidiva csoportokra és a négy csoport expressziós értékeit vetettük össze a kontroll mintákban mért expressziós értékekkel. A 7. ábrán látható, hogy a legmagasabb érték a gyermekkori recidiva csoportban volt detektálható és érdekes módon a legalacsonyabb normalizált mRNA expressziós szinteket a felnőtt recidiva esetekben mértük. A többszörös tesztelés korrekcióját figyelembe véve egyik betegcsoport sem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll értékekhez képest, de a teljes adathalmazra számított K-W teszt Dunn-féle p értéke 0,048 volt. Ha egyenként hasonlítottuk össze a négy betegcsoport expressziós értékeit a kontroll értékekkel, akkor mind a két gyermekkori betegcsoport szignifikánsan magasabb expressziós szintekkel rendelkezett a kontrollokénál (gyermekkori egyszeri cholesteatoma-kontroll összehasonlítás: $p = 0,048$; a gyermekkori recidiva cholesteatoma-kontroll összehasonlítás: $p = 0,041$).



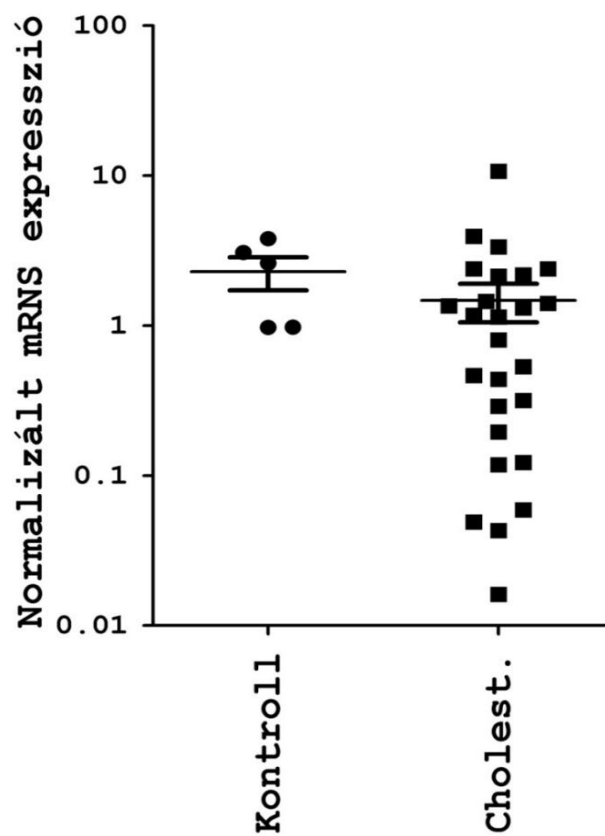
7. Ábra. A recidiváló és nem recidiváló (egyszeri) gyermek és felnőttkori csoportokban a c-MYC gén expressziójának eloszlása. A cMYC gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr valamint a recidiva hajlam alapján tovább csoportosított gyermek- és felnőttkori cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán.

Eredményeink alátámasztják az irodalomban korábban közölt c-MYC expressziós eredményeket, ami azért is fontos, mert a korábbi közleményekben immunhisztokémiai módszerekkel, fehérje szintű expressziót vizsgáltak.

5.2.2. A KRT1 és KRT10 gének expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

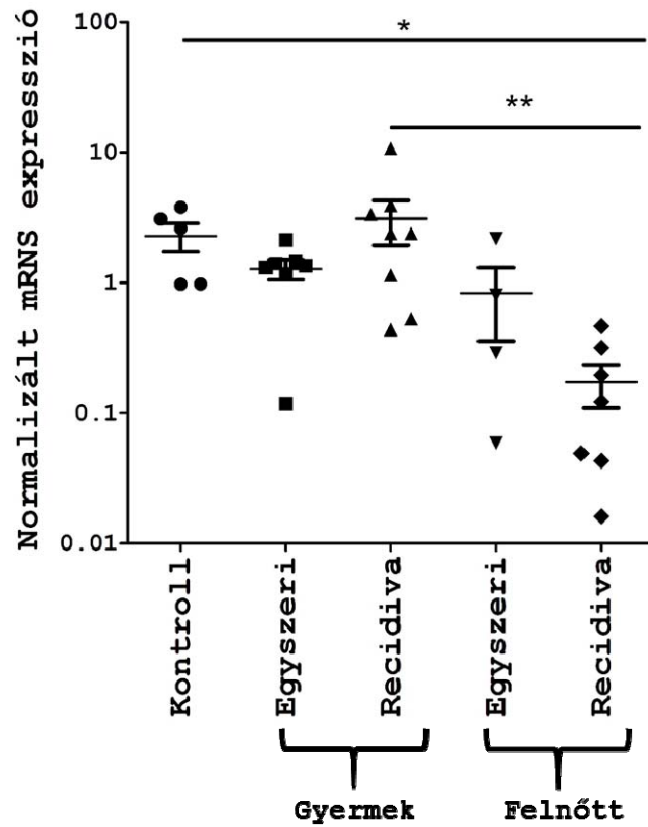
Bár különböző kromoszómákon találhatóak, a KRT1 és KRT10 gének együttesen expresszálódnak a keratinociták terminális differenciációja során, ugyanis fehérje termékeik funkcionális dimert képeznek. A vártak megfelelően a két gén normalizált expressziós értékei nagyon hasonlóak voltak minden vizsgált csoportban, azonban a KRT10 expressziós szintje magasabb volt, mint a KRT1-é. A továbbiakban csak a KRT10 gén esetében kapott eredményeket mutatom be az ábrákon.

A cholesteatoma csoportban a KRT10 expresszió alacsonyabb, mint a kontroll bőr mintákban, de a különbség nem szignifikáns (8. ábra).



8. Ábra. A KRT10 gén expressziója cholesteatomában. A KRT10 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr valamint cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán.

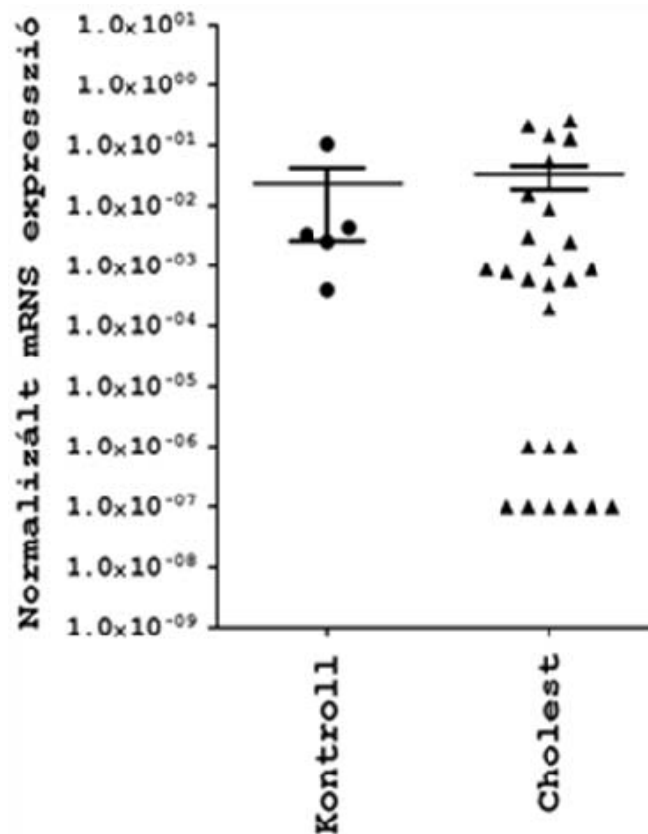
A tovább bontott beteg csoportok esetében az RT-PCR meghatározások adatainak értékelése azt mutatta, hogy az mRNS expresszió szignifikánsan különbözött a kontroll és a stratifikált cholesteatoma csoportok között [a KRT1 és a KRT10 esetében a K-W teszt Dunn féle $p = 0,004$ és K-W teszt Dunn féle $p = 0,0031$] (9. ábra). A KRT10 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt a kontroll mintákban a felnőttkori recidiváló csoportéhoz képest ($\mu \pm SD = 2,287 \pm 1,270$ és $\mu \pm SD = 0,172 \pm 0,166$; a Dunn féle $p < 0,05$). A KRT10 gén hatásának mértéke (effect size) = -2,33. A gyermekkori recidiváló esetekben a KRT10 expressziója szintén szignifikánsabb magasabb volt, mint a felnőttkori recidiválóban (gyermekkori cholesteatoma $\mu \pm SD = 3,106 \pm 3,150$ és felnőttkori cholesteatoma $\mu \pm SD = 0,172 \pm 0,166$; a Dunn féle $p < 0,01$) (9. ábra). A KRT10 gén hatásának mértéke ebben az összehasonlításban 1,27 volt.



9. Ábra. A KRT10 gén expressziója nem recidiváló (egyszeri) és recidiváló, gyermek és felnőttkori csoportokban. A KRT10 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr valamint a recidiva hajlam alapján tovább csoportosított gyermek - és felnőttkori cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán. A szignifikancia szintet jelző értékek: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.2.3. A KRT19 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

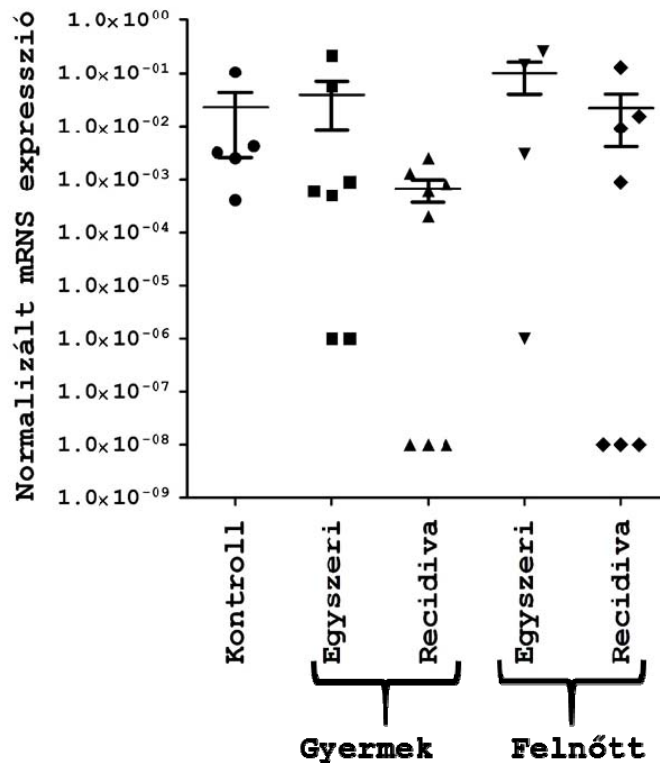
A KRT19 minden mintában gyengén expresszálódott és expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést, a kontrollként használt normal bőr és a cholesteatoma csoport mintái között (10. ábra).



10. Ábra. A KRT19 gén expressziója kontroll és cholesteatoma mintákban. A KRT19 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr valamint cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán.

Ha a cholesteatoma mintákat csoportbontásban vizsgáljuk és páronként hasonlítjuk az expressziós értékeket a kontroll értékekhez, akkor megfigyelhető, hogy a két recidiváló csoportban detektáltuk alacsony expressziós szinteket. A kontroll-gyermekkori recidiva

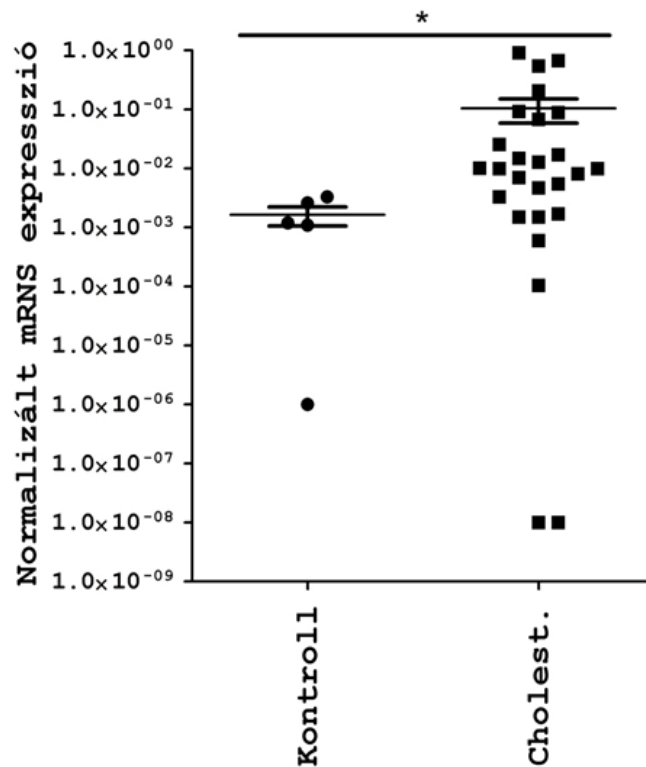
összevetésben $\mu \pm SD = 6,750 \times 10^{-4} \pm 7,730 \times 10^{-4}$; a kontroll-felnőttkori recidiva összevetésben $\mu \pm SD = 2,209 \times 10^{-2} \pm 0,04$ (11. ábra).



11. Ábra. A KRT19 gén expressziója nem recidiváló (egyszeri) és recidiváló, gyermek és felnőttkori csoportokban. A KRT19 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr valamint a recidiva hajlam alapján tovább csoportosított gyermek- és felnőttkori cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a $\pm SD$ értékeit is jelöltük az ábrán.

5.2.4. A MMP9 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

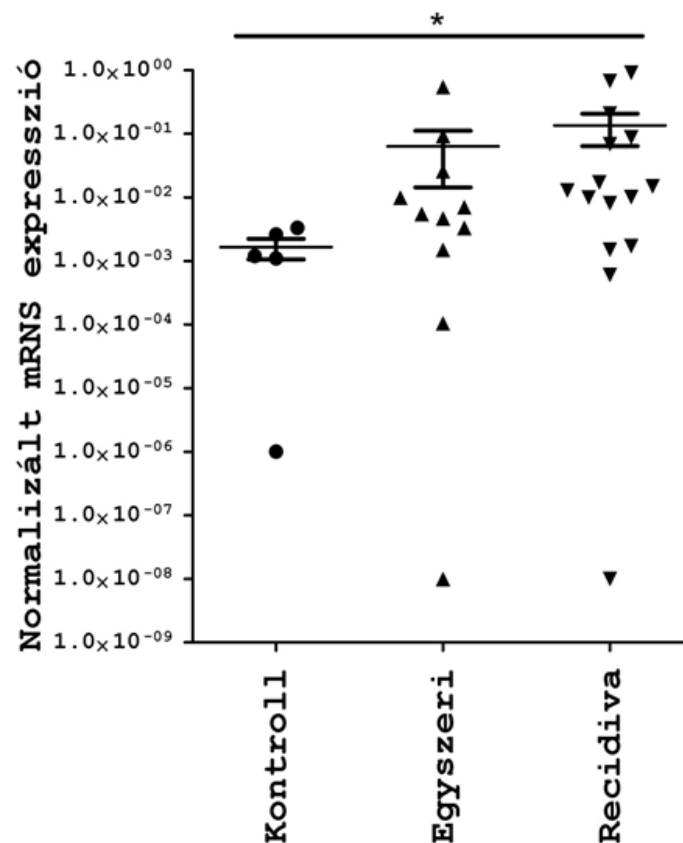
Az MMP9 esetében az mRNS expresszió szintje szignifikánsan emelkedett volt a cholesteatoma mintákban a normál bőrhez viszonyítva (kontroll $\mu \pm SD = 0,0164 \times 10^{-1} \pm 0,0131$; cholesteatoma: $\mu \pm SD = 1,046 \times 10^{-1} \pm 0,2336$ $p = 0,0276$) (12. ábra).



12. Ábra. A MMP9 gén expressziója kontroll és cholesteatoma mintákban. Az MMP9 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr és cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a $\pm SD$ értékeit is jelöltük az ábrán. A szignifikancia szintet jelző értékek: * $p = <0,05$.

A cholesteatoma minták egyszeri előfordulás és recidíva csoportokra bontása esetén a szignifikáns különbség a kontroll és recidíva csoportok között maradt meg (kontroll: $\mu \pm SD = 0,0164 \times 10^{-1} \pm 0,0131$; a recidiváló esetekben $\mu \pm SD = 1,351 \times 10^{-1} \pm 0,276$; a Dunn-féle $p < 0,05$) (13. ábra). Az MMP9 gén hatásának mértéke 0,90. A legmagasabb MMP9 expressziót

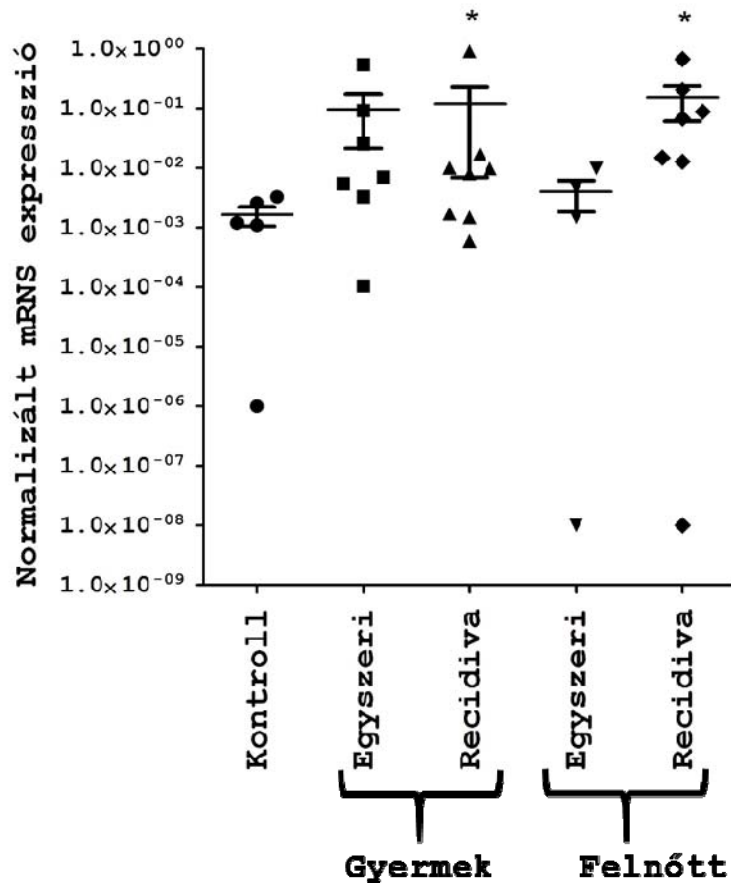
felőtt-és gyermekkori recidiváló minta-csoportban mértük, a legalacsonyabbat a felőttkori nem recidiváló csoportban (a felsorolásnak megfelelően $\mu \pm SD = 1,517 \times 10^{-1} \pm 0,2401$; $\mu \pm SD = 1,205 \times 10^{-1} \pm 0,321$ és $\mu \pm SD = 4,022 \times 10^{-3} \pm 4.379 \times 10^{-3}$).



13. Ábra. A MMP9 gén expressziója nem recidiváló (egyszeri) és recidiváló cholesteatomában. Az MMP9 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr és cholesteatoma, valamint a recidiva hajlam alapján csoportosított cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a $\pm SD$ értékeit is jelöltük az ábrán. A szignifikancia szintet jelző értékek: * p < 0,05.

A cholesteatoma minták csoportokra bontása esetén a többszörös tesztelés figyelembe vétele miatt nem mutatkoztak szignifikáns különbségek a négy csoport MMP9 mRNS

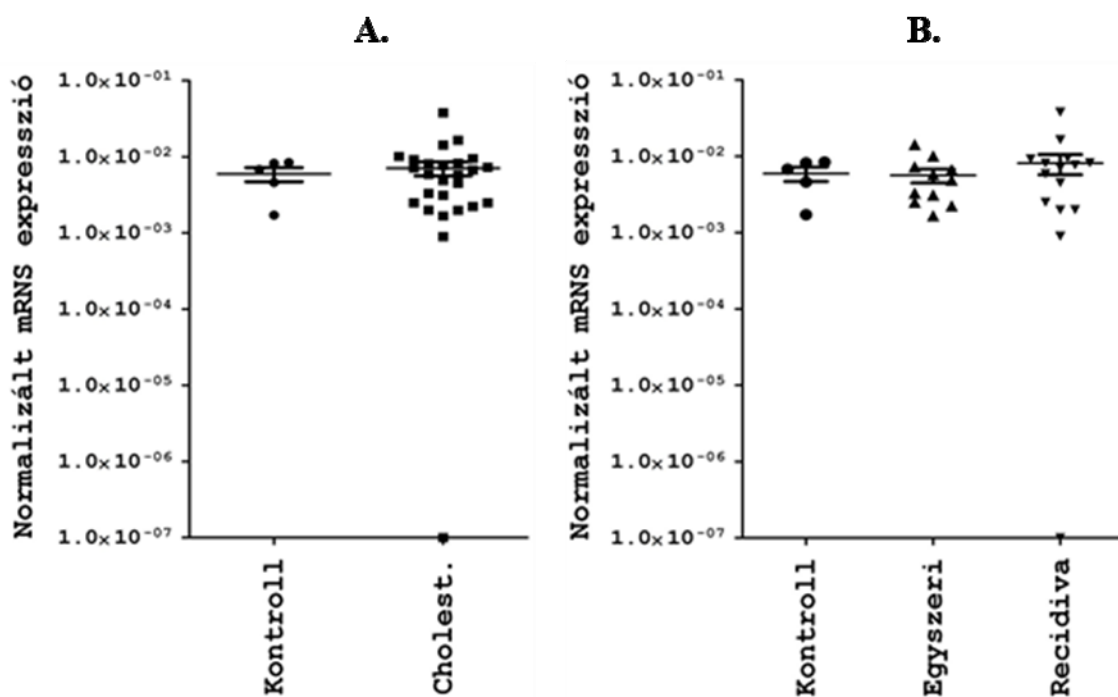
expressziójában. Ha azonban a négy csoport mRNS expresszió értékeit egyenként vetettük össze a kontroll csoport értékeivel, akkor szignifikáns különbség volt kimutatható a kontroll csoport és a gyermek- és felnőttkori recidíva betegek expressziós értékei között (14. ábra).



14. Ábra. A MMP9 gén expressziója nem recidiváló (egyszeri) és recidiváló, gyermek és felnőttkori cholesteatomákban. Az MMP9 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr valamint a kor és recidiva hajlam alapján tovább csoportosított gyermek- és felnőttkori cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán. A szignifikancia szintet jelző érték: * $p \leq 0,05$; a * a kontrollal történt páronkénti összehasonlítás szignifikancia szintjét jelzi.

5.2.5. A TP53 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

A TP53 gén expressziója magasabb volt a recidiváló esetekben ($\mu \pm SD = 8,132 \times 10^{-3} \pm 9,274 \times 10^{-3}$), mint a nem recidiváló esetekben ($\mu \pm SD = 5,632 \times 10^{-3} \pm 2,808 \times 10^{-3}$). Azonban a csoportok mRNS expressziós értékei között nem volt szignifikáns különbség (15. ábra). A legmagasabb TP53 expressziót a négy cholesteatoma csoport közül a recidiváló gyermekkori cholesteatoma mintákban detektáltuk ($\mu \pm SD = 1,068 \times 10^{-2} \pm 0,001$), valamivel alacsonyabb értékeket mértünk a felnőtt nem recidiváló csoportban ($\mu \pm SD = 7,269 \times 10^{-3} \pm 5,256 \times 10^{-3}$), ezeket az értékeket nem ábrázoltuk.



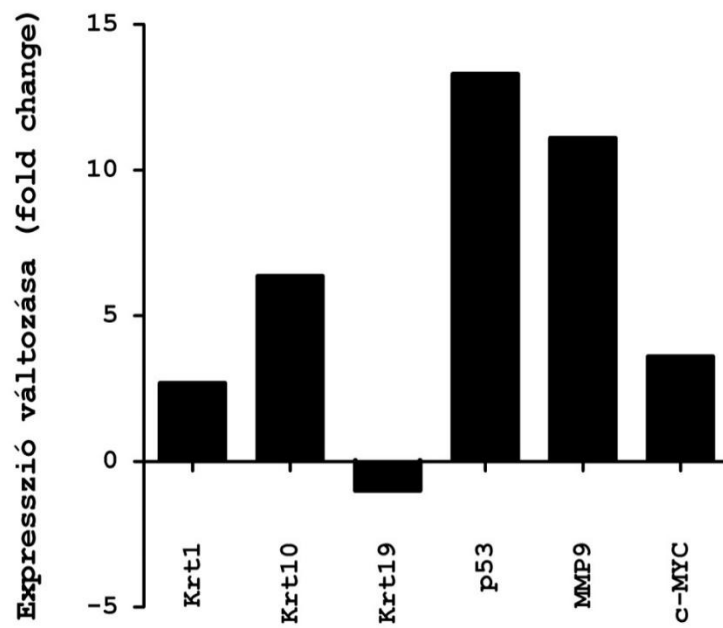
15. Ábra. A TP53 gén expressziója kontroll, nem recidiváló (egyszeri) és recidiváló cholesteatoma mintákban. A. A TP53 gén expressziójának vizsgálata kontroll retroauricularis bőr és cholesteatoma mintákban, B. A TP53 gén expressziójának vizsgálata

kontroll retroauricularis bőr valamint a recidiva hajlam alapján csoportosított cholesteatoma mintákban. A minták átlagát és a \pm SD értékeit is jelöltük az ábrán.

Adataink elemzésekor meg kell jegyeznünk, hogy a vizsgált géneknél mért génexpressziós értékek tartalmaznak kiugró értékeket is (különösen a KRT19 és az MMP9 esetében), amelyek befolyásolhatják a tesztek eredményét. Azonban nem akartuk csökkenteni a minták számát, különösen azért nem, mert a kiugró értékek nem feltétlenül rossz adatok, ezek a mérés variabilitását jelezhetik, ami az expressziós értékek eloszlásának „skewness” tulajdonságát, eltolódását jelzik.

5.3. Esettanulmány

A mintagyűjtési periódus során egy gyermekkori betegben recidiva alakult ki. Ez lehetőséget biztosított arra, hogy összehasonlítsuk az összes vizsgált gén expressziós szintjét ugyanazon személy primer és recidiváló cholesteatoma mintái között. A génexpressziós változásokat a 16. ábrán mutatjuk be, az összes génnek megnövekedett az expressziós szintje a recidiváló mintában, kivéve a KRT19-et, amely sokkal alacsonyabb expressziót mutatott.



16. Ábra. Esettanulmány, egy beteg primer szerzett és recidiváló cholesteatoma génexpresszió változása. Egy recidív cholesteatomában szenvedő beteg génexpressziós szintjeinek összehasonlítása a cholesteatoma első illetve ismételt megjelenésekor vett mintákból.

VI. Megbeszélés

Munkánk során a fülészet számára a mai napig is microchirurgiai kihívást jelentő középfül betegség, a cholesteatoma kialakulásának genetikai hátterét vizsgáltuk. Kísérleteink célja a sejtciklus szabályozásában és a keratinociták sejtéresi folyamatában feltételezhetően szerepet játszó néhány gén expressziójának vizsgálata volt.

A cholesteatomás szuppuratív otitis media egy krónikus gyulladós folyamat. A cholesteatomában a komplex gyulladós folyamat során a mátrix és perimatrix kölcsönhatása következtében inflammatorikus mediátorok (EGF, TGF- α,β , IL-6, IL-1 és GM-CSF), sejtfelszíni markerek és adhézións molekulák (integrin1,6, ICAM, ELAM), interakciója eredményeként a keratinocita sejtek megváltozott differenciációja és hiperproliferációja figyelhető meg. A cholesteatomában a megváltozott sejtéresi és proliferációs folyamatot több kutatócsoport is igazolta (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24). Analizálták a perimátrix vastagságát, a szubepiteliális angiogenezist, a sejtadhézións molekulák eloszlását, a sejtosztódás intenzitását a két életkori csoportban. A gyermek és a felnőttkori cholesteatomák viselkedését összehasonlítva klinikai adatok alapján kimutatható, hogy a gyermekkori esetek agresszívebbek viselkedésűek, mint a felnőttkoriak (18, 19, 25).

A daganatképződés egy többlépcsős folyamat, extrinsic faktor/ok hatására genetikai változások jönnek létre, melyek hatására megváltozik többek között a differenciálódás és a sejtosztódás regulációja, ami daganat kialakulásához vezet. A cholesteatoma esetén az extrinsic faktor a krónikus irritatív gyulladás folyamata, illetve a humán papillomavírus jelenléte lehet. Ezen tényezők befolyásolhatják a sejtproliferáció/apoptózis egyensúlyát.

Cholesteatoma mintákban számos kutatócsoport próbált meg azonosítani genetikai elváltozásokat, amelyek magyarázhatják a betegség jellegzetes klinikai viselkedését (11, 15, 34, 35, 36). Fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálatok során cholesteatomában több kromoszóma számbeli eltérését is detektálták. Yildirim és munkatársai a 8-as kromoszóma, Lavezzi a 7-es kromoszóma, Ecsedi és munkatársai a 7-es, 8-as, 17-es kromoszóma számbeli aberrációját mutatták ki. Ezen kromoszóma eltérések jó támpontot adhatnak a betegség kialakításában résztvevő, ezekre a kromoszómákra lokalizálódó a sejtciklust, sejtproliferációt és differenciálódást reguláló gének azonosítására (39, 40, 41). A legújabb citogenetikai, microarray és proteom vizsgáló módszerek alkalmazásával lehetőség nyílt egyidejűleg nagyszámú gén, fehérje analízisére, melyek bizonyos betegségek patomechanizmusában résztvesznek. Teljes genom microarray expressziós analízissel és nagy áteresztőképességű (high throughput) proteomikai vizsgáló módszerrel történt mérések során többszáz, a cholesteatoma progressziójában szerepet játszó gént és fehérjét azonosítottak (gének: Lipocalin2, MMP1, MMP9, MMP10, MMP12, BCL2L1, CEACAM6, S100A7, S100A9, PAX, SERPINB3, SERPINB4, KRT6 A/B, KRT18, KRT19, KRT8; fehérjék: STS, CEACAM6, PRTN3, ELANE, MPO, MMP9, HTRA1, S100A7, S100A16/18, S100A7A, S100A12, S100A7, S100A8, S100A9, COL18A1, NID2, KRT4, KRT 7/8/19, PFN2) (39, 40, 42). A megváltozott expressziót mutató gének és fehérjék nagy része tumorok kialakulásában is szerepet játszik, a cholesteatomában talált expressziós mintázat tehát tumorszerű alterációhoz hasonló, mellyel magyarázható a cholesteatomás megbetegedés jellegzetes fenotípusa (42, 43).

Vizsgálatainkba 26 szerzett cholesteatomát vontunk be, 11 felnőttkorit illetve 15 gyermekkori esetet. A pontosabb analízis érdekében a betegeket a klinikai adatok alapján a recidíva hajlam szerint tovább kategorizáltuk szerzett (nem recidiváló) és recidiváló

csoporthoz. A recidiváló esetekben a cholesteatoma a műtéti adatok alapján a középfül rendszer több régióját érintette a nem recidiváló mintákhoz képest.

Kísérleteinkben a c-MYC, TP53, KRT1, KRT10, KRT19 és MMP9 gének expressziós mintázatát vizsgáltuk a 26 műtéti úton eltávolított cholesteatoma mintában. Kontrollként 5 retroauricularis régióból származó normál bőrt használtunk. A c-MYC gén expresszióját a cholesteatomához hisztológiailag nagyon hasonló de benignus kásadaganatból, az atheromából származó mintákban (N=15) is meghatároztuk. A két ciszta klinikailag eltérően viselkedik, míg a cholesteatoma a középfül üregrendszerét destruálja, csontpusztulást okozva, mely halláscsökkenéssel, szédüléssel, fülfolyással jár, súlyosabb esetben intracraniális szövődményként a koponyaüregbe is betörhet, a durát is érintheti. Addig az atheroma sebészi *in toto* eltávolítása után szövődménymentesen gyógyul. A cholesteatoma *in toto* körültekintően elvégzett sebészeti eltávolítása esetében is gyakran recidivál.

A c-MYC emelkedett expressziója többek között a fej-nyaki daganatokban is gyakran detektálható, ezért döntöttünk ennek az onkogénnek a vizsgálatára mellett. A c-MYC-nek központi szerepe van a sejtciklus szabályozásában, fokozott működésével fokozott proliferációt generál, ami gyakran a DNS károsodásával jár ezzel befolyásolva a sejtciklus és differenciálódás folyamatát és az anti-apoptotikus faktorok képződésén keresztül az apoptózist is. Mivel a c-MYC a sejtosztódáshoz nélkülözhetetlen, abnormális működése számos daganatban kimutatható, prognosztikai szempontból is nagyon fontos expressziójának szintje (50, 51, 52, 53, 54). Vizsgált mintáinkban a c-MYC expressziója szignifikánsan magasabb volt cholesteatomában az atheromához és a normál bőrhöz képest. A cholesteatoma mintákban az is látható, hogy a gyermekkori esetekben magasabb a c-MYC mRNS expressziós szint a felnőttkorihoz képest. A legmagasabb expressziós szinteket pedig a recidiváló gyermekkori esetekben detektáltuk. A két szövettanilag nagyon hasonló epidermalis ciszta mátrixát vizsgálva kísérleti eredményeink korrelálnak a két betegség

klínikailag eltérő viselkedésével. Az atheromához és a normál bőrhöz viszonyítottan a cholesteatomában az emelkedett c-MYC expresszió fokozott sejtaktivitására, proliferációra utal. Ez részben magyarázatot adhat a cholesteatomára jellemző agresszív viselkedésre, recidívára való hajlamra, ami nem jellemző az atheromára.

Munkánkat folytatva, cholesteatoma mintáinkban a sejtciklus regulációjában lényegi szereppel bíró TP53 gén, a keratinocita sejt differenciációs folyamatában fontos, annak jellemzésére alkalmas citokeratin gének - KRT1, KRT10 és KRT19 - és a daganatok progressziójában kiemelkedő szerepet játszó MMP9 gén expressziós szintjeit határoztuk meg.

Chung és munkatársai vizsgálták a TP53-t cholesteatomában. Eredményeik megváltozott apoptotikus-antiapoptotikus folyamatot igazoltak, az antiapoptotikus folyamat dominanciájával (44). A kaszpázok és a TP53 vizsgálatát leíró tanulmányok azt erősítik meg, hogy a cholesteatomában egy fokozott sejtciklus aktivitás, fokozott programozott sejtelhalás és sejtproliferáció figyelhető meg, melyet alátámaszt, illetve magyaráz a TP53 és c-MYC interakciója is (10, 45, 46, 47, 50, 58, 80). Proliferációs markerek vizsgálatával Chung és munkatársai is igazolták a gyermekkori és felnőttkori cholesteatomák eltérő viselkedését, a gyermekkori korosztálynál agresszívabb megjelenést találtak (7, 18, 19, 58, 66). Ezen eredményekhez hasonló génexpressziós eltéréseket detektáltunk mi is munkánkban.

A TP53 expressziója a gyermekkori és a recidiváló esetekben volt a legmagasabb, mely fokozott sejtciklus aktivitásra, fokozott apoptózisra utalhat. A TP53 és a c-MYC koexpressziója, és azok ismert interakciója alátámasztja kapott eredményeinket. A TP53 gént szabályozó enhancer tartalmaz egy c-MYC- felismerési szekvenciát, ide kötődve a c-MYC emeli a TP53 expresszióját (50, 80).

A normál keratinocitákban a differenciálódás egy többlépcsős folyamat, ezért a normál bőrben minden sejtrétegnek megvan a jellegzetes citokeratin mintázata (81). A citokeratinok az intermedier filamentum fehérje szupercsalád tagjai, amelyek az epiteliális eredetű sejtekben vannak jelen, jellemzően a sejtciklus működéséhez és differenciáltságtól függ expressziójuk. Ezért a citokeratinokat gyakran használják a sejt migráció, a differenciálódás és a proliferációs állapot jellemzésére és ennek megfelelően a daganatképződés markerei az epiteliális sejtekben (59, 60, 61). A citokeratinok és más fehérjék közötti kölcsönhatások modulálják a sejtek migrációját, invázióját és metasztázisát szabályozó jelátviteli kaszkádokat. E feltevés szerint a citokeratinok specifikus expressziós mintázata gyakran korrelál bizonyos daganatok prognózisával és metasztázis potenciáljával, így például az emlőrákban és a szájüreg daganataiban (63, 82).

Számos kutatócsoport vizsgálta a cholesteatomában a citokeratin 10 expresszióját. Jelenlétét az érettebb suprabazális rétegben detektálták. Fokozottabb expresszióját igazolták a gyermekkori esetekben, ezzel bizonyítván a gyermekkori esetek fokozottabb proliferációs aktivitását (70, 71). Ezeket az eredményeket a mi adataink is alátámasztják, hiszen a legmagasabb expressziós szintet a gyermekkori recidiváló esetekben mértünk.

A KRT1 bár eltérő kromoszómán lokalizált, mégis együtt expresszálódik a KRT10 génnel az epidermisz suprabazális rétegében, mivel a fehérjetermékeiről ismert, hogy heteroduplexet képeznek a sejtekben (62, 63, 64). A KRT1/KRT10 komplex megnövekedett expressziója a keratinociták terminális differenciáltságát jelzi (62, 70). Cholesteatoma mintáinkban mind a KRT1 mind a KRT10 gén azonos expressziós mintázatokat mutatott. Ezek az adatok belső kontrollként is szolgálhatnak méréseink pontosságának ellenőrzésére. A KRT1 és KRT10 gének expressziós szintje magasabb volt a gyermekkori recidiváló csoportban a kontroll csoport és nem recidiváló gyermekkori esetek mintáihoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns. A két gén fokozott expressziója folyamatos keratinocita

differentiálódási és keratinizációs folyamatra utal, ami adataink szerint fokozottabb a gyermekkori recidiváló esetekben. A KRT1/10 komplex fokozott expressziója jobb prognózisú, jól differenciált fej-nyaki tumorokra is jellemző (63). Érdekes módon a KRT1 és a KRT10 szignifikánsan csökkent az expressziója a felnőttkori cholesteatomás csoportban, amely a keratinociták differenciálódási folyamatának megváltozását jelzi a dedifferenciálódás felé, különösen a recidiváló esetekben.

A legújabb kutatási eredmények szerint normál sejtekben a citokeratin 19 tumorszupresszor funkciót tölt be. Negatívan szabályozza az Akt jelátviteli útvonalat az Egr1 nukleáris lokalizációjának modulálásával. A KRT19 kapcsolódik a β -catenin/RAC1 komplexhez és fokozza a β -catenin nukleáris transzlokációját és a NUMB gén expresszióját, így gátlódik a NUMB-függő NOTCH jelátviteli útvonal és a sejtproliferáció (65, 66, 67). Mintáink között a recidiváló esetekben mértük a legalacsonyabb expressziós szintet, mely a sejtproliferáció fokozott szintjére utal. Ennek az ellenkezője figyelhető meg a nem recidiváló csoportokban, ahol a KRT19 mRNS emelkedett szintjét detektáltuk. A recidiváló esetekben az alacsonyabb citokeratin 19 expresszió prognosztikai szemponttal bírhat, a rosszabb prognózist valószínűsíti (68).

A IV/V típusú kollagenáz mátrix metallopeptidáz 9 (MMP9) enzim normál fiziológiai folyamatokban és patológiás körülmények között is bonthatja az extracelluláris mátrixot. Számos tanulmány szerint fokozott expressziója szükséges a szöveti átalakuláshoz a tumor progressziója során az invázióhoz és a metasztázisok generálásához. Számos kutatócsoport vizsgálta az MMP szerepét a cholesteatomában. Megállapításuk szerint ebben a betegségben a csontdestrukció mértékével arányos az MMP9 fehérje expressziója. (73, 74, 75, 76, 77, 78). Saját eredményeink azt mutatják, hogy a kontroll mintákhoz képest az MMP9 expressziója szignifikánsan megnövekedett mindkét recidiváló cholesteatoma csoportban. A legmagasabb mRNS expressziós szint a felnőtt recidiváló esetekben volt mérhető. Az MMP9

megnövekedett expressziója valószínűleg fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix proteolízisében és a helyi csontpusztulásban. A csontdestrukció, a cholesteatoma terjedésének kórjelzője, ezért jó prognosztikai faktor lehet az invazivitásért felelős MMP9 expresszió. A mintáinkban kimutatott emelkedett c-MYC expresszió cholesteatomában, hozzájárulhat a megnövekedett MMP9 expresszióhoz, mivel az MMP9 gén promotere előtt c-MYC kötőhely található (81).

Mintagyűjtésünk időtartama alatt egy primer szerzett cholesteatomás betegben újra kialakult cholesteatoma, ami lehetőséget adott számunkra, hogy összehasonlíthassuk a vizsgált gének expresszióját ugyanannak a betegnek a primer szerzett és recidiváló cholesteatoma mintájában. A citokeratin gének expressziós mintázata eltérő volt a primer és recidiváló mintákban. A KRT1/10 gének expressziója megemelkedett, míg a KRT19 gén alacsonyabban expresszálódott a recidiva mintában a primer minta értékeihez képest. A c-MYC, TP53, és MMP9 expressziója szintén emelkedett a recidiva mintában. Ez az esettanulmány is alátámasztja, hogy recidiva esetén magasabb a sejproliferációs és invazivitási potenciál, illetve a KRT19 csökkent szintje rosszabb prognózist valószínűsít.

A cholesteatoma terjedésével betör a középfül üregrendszerébe. A cholesteatoma zsák terjedése, növekedése során egyrészt mechanikai hatást gyakorol a csontállományra, másrészt a cholesteatoma mátrix, perimátrix és a csontállomány között létrejövő komplex interakciók következtében a csont modelling-remodelling mechanizmus a csontreszorpció irányába mozdul el, csontdestrukcióhoz vezetve. A cholesteatomában a csontpusztulás folyamatának kiváltó oka lehet a cholesteatomára jellemző krónikus, irritatív gyulladás. Elképzelésünk szerint ez a folyamat a c-MYC és TP53 gének expressziójának emelésével kiválthatja a sejtciklus/proliferáció aktiválódását. A keratinociták proliferatív aktivitásukkal és módosult differenciációjukkal hatással lehetnek a csontanyagcserére, illetve az extracelluláris mátrix

bontására, az invazivitásért felelős folyamatok aktiválására. Így ebben a betegségben a sejtciklus és csontanyagcsere változásával a citokeratinok expressziós mintáztatának módosulásával is jár, ami egy fokozottabb sejtburjánzást tesz lehetővé. Ezzel az inkomplett differenciációs folyamattal alakulhat ki a cholesteatomás megbetegedés.

Összefoglalva: vizsgálatunkkal több, a tumorigenezisben szerepet játszható regulációs gén megváltozott expresszióját igazoltuk cholesteatomában. Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a cholesteatoma kialakulása hátterében zajló patomechanizmus molekuláris eltéréseihez, valószínűsítve ezzel a cholesteatoma neoplasztikus malformációt.

6.1. A PhD értekezés új eredményeinek rövid összefoglalása

Tanulmányunk elsőként ír le olyan sejtciklus működésére ható genetikai eltéréseket, amelyek segítségével világosabbá vált a cholesteatoma patomechanizmusa, klinikai viselkedése:

1. Elsőként vizsgáltuk a betegeket kor és recidiva hajlam alapján csoportokra bontva műtéti cholesteatoma mintákban a c-MYC, KRT1/10, KRT19, MMP9 és TP53 gének expressziós mintáztatát kvantitatív real time PCR segítségével. Ez a vizsgálat lehetővé tette a gének expressziójának mennyiségi analízisét, ezzel pontosabban meg tudtuk határozni az általunk vizsgált gének a betegség patomechanizmusában betöltött szerepét.

2. Kutatócsoportunk elsőként végzett összehasonlítást a cholesteatoma és egy másik epidermalis ciszta, a kásadaganat (atheroma) mintáiban mérhető c-MYC gén expressziós értékei között, kontrollként normál bőrmintákat használva. A c-MYC protoonkogén expressziójának cholesteatomában kapott szignifikáns emelkedése valószínűsíti a c-MYC gén

cholesteatoma patomechanizmusában betöltött, a tumor növekedéséhez szükséges sejtproliferációt serkentő szerepét.

Mivel az általunk vizsgált TP53 és MMP9 gének promoterében c-MYC kötőhely található, így a c-MYC overexpressziója a TP53 és az MMP9 génexpressziós szintjére is pozitív hatással lehet. Ezzel magyarázható ezeknek a géneknek a kísérleteinkben észlelt fokozottabb expressziója. Így a c-MYC overexpresszió közvetetten is hatással lehet a recidiva kialakulására.

3. Az elmúlt években igazolódott a citokeratin 19 tumorszupresszor szerepe. A recidiváló cholesteatomás esetekben az általunk meghatározott KRT19 mRNS szint alacsonyabb, mint a nem recidiváló esetekben, így elsőként sikerült igazolni cholesteatomában a citokeratin 19 tumorszupresszor szerepét, ami befolyásolja a cholesteatoma progresszivitását.

4. Tanulmányunkban elsőként mutattuk ki a klinikai adatok és recidíva hajlam szerint kategorizált betegekben c-MYC, a KRT1/10, KRT19, TP53, MMP9 gének mintázatának különbözőségeit a különböző csoportokban. Részben ezek a mintázatbeli eltérések magyarázhatják a két korcsoportban előforduló cholesteatoma invazivitási és agresszivitási különbözőségét is.

5. Az ismertetett esettanulmány pontosítja a recidiváló esetekre jellemző genetikai eltéréseket, melyek befolyásolják a fokozottabb sejtaktivitást, invazivitási potenciált, és melyek rosszabb prognózist valószínűsítenek.

6. Vizsgálatunkkal több, a tumorigenezisben szerepet játszó regulációs gén megváltozott expresszióját igazoltuk cholesteatomában, valószínűsítve ezzel a cholesteatoma neoplasztikus malformációját.

VII. Összefoglalás

A cholesteatoma a középfülben kialakuló ectopiás keratinózus ciszta, melyet lokálisan invazivitás jellemez, ami súlyos szövődményeket okozhat a középfülben. Leggyakoribb a hallócsontláncolati destrukció, halláscsökkenés, fülfolyás, szédülés, és az intracraniális szövődmények. A cholesteatoma terápiaja annak műtéti eltávolítása, azonban még gondos műtéti eltávolítás után is a betegségnek magas a recidiva hajlama, főként a gyermekkori esetekben.

Munkánk célja volt, a cholesteatomás megbetegedés hátterében álló genetikai, génexpressziós eltérések pontosabb, szélesebbkörű feltárása.

Kísérleteink során revez transzkripciót követően kvantitatív PCR módszerrel analizáltuk a cholesteatoma patomechanizmusában feltételezésünk szerint kulcsfontosságú szerepet játszó gének expressziójában bekövetkező változásokat. Munkánk során a cholesteatoma eseteket kor és klinikai adatok alapján felnőtt és gyermekkori csoportokra, majd mindkét betegcsoportot tovább kategorizáltuk szerzett (nem recidiváló, egyszeri) és recidiváló csoportokra.

Munkánk során a cholesteatomában detektált c-MYC protoonkogén expresszióját hasonlítottuk össze egy másik hisztológiailag hasonló keratinosus cisztában az atheromában (kásadaganat, epidermalis ciszta), valamint a normál bőrben mérhető értékekkel. A cholesteatomában szignifikánsan emelkedett volt a c-MYC expressziója az atheromához és a kontrollként használt normál bőrhöz képest. A kásadaganat a klinikumban nem okoz számottevő szövődményt ellentétben a cholesteatomával. Ezt az eltérő klinikai viselkedést a c-MYC protoonkogénnel kapott vizsgálati eredményeink részben magyarázhatják. Ezt követően a cholesteatoma mintákat tovább vizsgáltuk más tumor releváns gének – sejtciklust

szabályozó fehérjét kódoló TP53, a citokeratin 1, 10 és 19 fehérjéket kódoló KRT1,10, és 19 gének, és egy mátrix metalloproteinázt kódoló gén, az MMP9 – mRNS szintjeinek mérésével.

A KRT1 és KRT10 gének expressziós szintjei nagyon hasonló mintázatokat mutattak a kontroll és beteg csoportokban, a KRT1/10 expresszió magasabb volt a gyermekkori recidiváló csoportban a kontroll csoporthoz és nem recidiváló gyermekkori esetekhez képest. A két gén fokozott expressziója folyamatos keratinocita differenciálódási és keratinizációs folyamatra utal, mely adataink szerint fokozottabb a gyermekkori recidiváló esetekben. A KRT1/10 komplex fokozott expressziója a jól differenciált fej-nyaki tumorokra is jellemző.

A tumormarkerként gyakran vizsgált citokeratin 19 fehérje a legújabb kísérleti adatok alapján tumorszupresszor funkciót tölt be sejtekben. A nem recidiváló cholesteatomás esetekben magasabb volt a KRT19 gén expressziós szint, mint a recidiválóakban. Ez arra utal, hogy a recidiváló esetekben valószínűleg magasabb volt a sejtproliféarció mértéke, mely rosszabb prognózist valószínűsít. Elsőként mértünk tehát olyan expressziós értékeket, amelyek ennek a citokeratinnak a cholesteatoma patomechanizmusában játszott szerepének fontosságát mutatják.

A mátrix metalloproteináz 9 jelentős szereppel bír a tumor progresszióban, invazivitásban. Vizsgálatunkban az MMP9 expressziója szignifikánsan emelkedett volt a recidiváló esetekben, főként a felnőttkoriakban, amely fokozottabb invazivitást igazol. A TP53 gént vizsgálva szintén fokozottabb expressziót detektáltunk a recidiváló cholesteatomás esetekben, mely egy a sejtciklus zavarára utalhat. A recidiváló csoportok mintáiban az MMP9 és a TP53 gének esetében észlelt megemelkedett expressziós szintek a c-MYC protoonkogén emelkedett szintjével hozhatóak összefüggésbe, ugyanis a TP53 és MMP9 gének promoter szakaszán c-MYC kötőhely található.

Az ismertett esettanulmány pontosítja a recidiváló esetekre jellemző genetikai eltéréseket, melyek okozhatják a fokozottabb sejtproliferációt, invazivitási potenciált, és amelyek rosszabb prognózist valószínűsítene.

Kísérleteink során számos gén megváltozott expresszióját sikerült kimutatnunk, a detektált genetikai változások hozzájárulhatnak a cholesteatoma patomechanizmusa pontosabb megértéséhez, valószínűsítve a cholesteatoma neoplastikus malformációját.

Summary

Cholesteatoma is an ectopic keratinous cyst developing in the middle ear, which is characterized by local invasiveness that may cause severe complications in the middle ear. The most common complications are the destruction of the auditory ossicles, hearing loss, otorrhea, dizziness, and intracranial complications. The therapy of the cholesteatoma is its surgical removal. However, even after careful surgical removal, the disease has a high tendency to recurrence, especially in childhood cases.

The objective of our study was to investigate the genetic and gene expression differences in the background of the cholesteatoma disease more precisely and more completely.

During our experiments, after reverse transcription, the changes in the expression of the genes that, we assume, play a key role in the pathomechanism of the cholesteatoma were analyzed using quantitative PCR method. During our study, the cholesteatoma cases were categorized into adult and children groups based on age and clinical data, and then both groups were further subdivided into acquired (non-relapsing, single) and relapsing groups.

During our work, the expression of the c-MYC protooncogene detected in the cholesteatoma was compared with the values of another histologically similar keratinous cyst, the atheroma

(epidermal cyst) and of the normal skin. The expression of the c-MYC in the cholesteatoma was significantly increased compared to the atheroma and the normal skin used as a control sample. Unlike the cholesteatoma, the epidermal cyst does not cause significant complications in the clinical practice. This difference in the clinical behaviour may partly be explained by the test results we have obtained which include the c-MYC protooncogene. Subsequently, we have examined the cholesteatoma samples further by measuring the levels of other tumour relevant genes – the TP53 encoding the cell cycle regulator protein, the KRT1, 10 and 19 genes that encode the cytokeratin 1, 10 and 19 proteins, and the MMP9 – mRNA, a matrix metalloproteinase encoding gene.

The expression levels of the KRT1 and KRT10 genes showed very similar patterns in the control and patient groups, the KRT1/10 expression was higher in the childhood relapsing group compared to the control group and the non-relapsing childhood cases. The increased expression of the two genes indicates a continuous differentiation and keratinization process of the keratinocyte, which, based on our data, is more pronounced in childhood relapsing cases. The increased expression of the KRT1/10 complex is also typical of the well-differentiated head and neck tumours.

According to the latest experimental data, the cytokeratin 19 protein, often studied as a tumour marker, has been shown to perform tumour suppressor functions in cells. In the non-relapsing cholesteatoma cases, the KRT19 gene's expression level was higher than in the relapsing cases. This suggests that the degree of cell proliferation was probably higher in the relapsing cases, which suggests worse prognosis. Thus, we were the first to measure expression values that show the importance of this cytokeratin in the pathomechanism of the cholesteatoma.

The matrix metalloproteinase 9 plays an important role in the tumour's progression and invasiveness. In our study, the expression of the MMP9 was significantly increased in the relapsing cases, mainly in the adulthood cases, which suggests increased invasiveness. Studying the TP53 gene, we have also detected increased expression in the relapsing cholesteatoma cases, which may indicate cell cycle disorder. The elevated expression levels of the MMP9 and TP53 genes detected in the samples of the relapsing groups may be related to the elevated levels of the c-MYC proto-oncogene, because there is a c-MYC binding place on the promoter section of the TP53 and MMP9 genes.

The presented case study clarifies the genetic abnormalities typical of the recurrent cases, which may cause increased cell proliferation, potential to invasiveness, and may suggest worse prognosis.

During our experiments, we have managed to detect the altered expression of a number of genes, and the detected genetic changes may contribute to a more accurate understanding of the pathomechanism of the cholesteatoma, suggesting the neoplastic malformation of the cholesteatoma.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Ars B.M.P.J. (1999) Pathogenesis of acquired cholesteatoma. Kugler Publications, The HAague, The Netherlands. pp.:1-18.
2. Kuo CH, Shiao AS, Yung M, Sakagami M, Sudhoff H. Updates and knowledge gaps in cholesteatoma research. Biomed Research International. 2015; <https://doi.org/10.1155/2015/854024>
3. Z. Szabó L. (2002) Tabularium Otorhinolaryngologiae. Melania Kiadó Kft.
4. Weber PC., Adkins WY. (1997) Congenitalis cholesteatomas in the tympanic membrane. Laryngoscope. 107: 1181-1184.
5. Underbrink M., Gadre A., Quinn FB, Ryan MW (2002) Cholesteatoma. Grand Rounds Presentation, UTMB, Dept.of Otolaryngology. pp.1-7.
6. Weiss P. (1961) Guiding principles in cell locomotion and cell aggregation. Exp. Cell. Res.8:260-281.
7. Ars B., De Craemer W, Ars-Piret N. (1989) The lamina propria and cholesteatoma. Clin. Otolaryngol.14:471-475.
8. Kuo CL (2014) Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research Laryngoscope 125:234-240.
9. Jeney A, Kenessey I, Timár F, Oláh J, Pogány G, Babó I, Harisi R (2006) A tumorok áttétképzését korlátozó hatóanyagok kutatása Magyar Onkológia 2:93-99.
10. Szőke T (2005) Glikohisztokémiai és mikrovaskularizációs prognosztikai faktorok tüdőrákban. Doktori értekezés. Kézirat. pp.:11-13.

11. Bujía J., Kim C., Boyle D., Hammer C., Firestein G., Kastenbauer E. (1996) Quantitative analysis of interleukin-1- α gene expression in middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope*. 106: 217-220.
12. Kamide Y, Sasaki H., Abramson M., Huang CC. (1991) Effects of epidermal Langerhans cell's conditioned medium on keratinocytes: a role of Langerhans cells in cholesteatoma. *Am J Otolaryngol*. 12(6): 307-315.
13. Mundy GR. (1993) Role of cytokines in bone resorption. *J Clinchem*. 53: 296-300.
14. Huang T., Shi-Du Y., Cheng-Chun H. (1989) Colony- stimulating factor in middle ear cholesteatoma. *Am J Otolaryngology*. 10: 393-8.
15. Bujía J., Kim C., Ostos P., Kastenbauer E., Hultner L.(1996) Role of interleukin 6 in epithelial hyperproliferation and bone resorption in middle ear cholesteatomas. *Eur-Arch-Otorhinolaryngol*. 253: 152-157.
16. Kuczkowski J., Sakowicz M., Izycka-Swieszewska E., Mikaszewski B., Pawelczyk T (2011) Expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *J otorhinolaryngol Relat Spec*. 73:93-9.
DOI:10.1159/000323831
17. Ottaviani F., Neglia CB., Berti E. (1999) cytokines and adhesion molecules in middle ear cholesteatoma. A role in epithelial growth? *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*. 119: 462-467.
18. Welkoborsky HJ., Jacob RS., Hinni ML. (2007) Comparative analysis of the epithelium stroma interaction of acquired middle ear cholesteatoma in children and adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 264: 841-848.
19. Quaranta A, Ressa L, Santangelo A (1986) Otomastoid cholesteatoma in children: histopathological findings. *Int J Oediatic Otorhinolaryngol* 12:121-6.

20. Dornelles C, da Costa SS, Meurer L, Schweiger C (2005) Correlation of cholesteatomas perimatrix thickness with patient's age. *Braz J Otorhinolaryngol.* 71:792-7.
21. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004. February). „Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases”. *Nature Reviews. Microbiology* 22:95–108.
22. Chole RA, Faddis BT (2002) Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch otolaryngol Head and Neck Surg.*128:1129-33.
23. Kao WT, Gagnon PM, Vogel JP, Chole RA (2016) FleQ, a transcriptional activator, is required for biofilm formation in vitro but does not alter virulence in cholesteatomas model. *Otol Neurotol.* 37: 977-83.
24. Baysal Aksoy N., Kara F., Taysi S., Taskin A., Bilinc H., Cevik C., Celenk F., Kanlikama M. (2013) Oxidative stress in chronic otitis media *Eur Arch otolaryngol* 270:1203-1208
25. Asher M., Erdag KT., Sarioglu S., Güneri AE., Ikiz ÖA., Uzun E., Özer E(2015) Assessment of subepithelial angiogenesis in acquired cholesteatoma between pediatric and adult patients *Turkish Archives of Otolaryngology* 53:47-50.
26. Moriyama H., Honda Y., Huang CC., Abramson M. (1987) Bone resorption in cholesteatoma: epithelial- mesenchymal cell interaction and collagenase production. *Laryngoscope.* 97:854-859.
27. Radics Tünde (2004) Immunológiai és inflammatorikus folyamatok vizsgálata krónikus apikális periodontitisz 1-69.

28. Hamzei M., Ventriglia G., Hagina M., Antonopolous A., Sprekelsen MB., Dazert S., Hildmann H., Sudhoff H (2003) Osteoclast stimulating and differentiating factors in human cholesteatoma. *Laryngoscope*. 113:436-442.
29. Jeong JH., Park CW., Tae K., Lee SH., Shin DH., Kim KR., Park YW. (2006) Expression of RANKL and OPG in middle ear cholesteatoma tissue. *Laryngoscope*. 116: 1180-1184.
30. Iwamoto Y., Nishikawa K., Imai R., Furuya M., Uenaka M., Ohta Y., et al(2016) Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction *Mol Cell Biol* 16;36: 1610-20.
31. Kopper L, Tímár J. (2007) A patológiai vizsgálatok szerepe a „célzott” terápia kialakításában, hatásának monitorozásában és a betegségek kimenetelének előrejelzésében. *Magyar Tudomány*. 8:990-995.
32. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (1994) *A patológia alapjai*. p.: 194-199.
33. Kopper L (2005) *Onkogenomika*. *Magyar Tudomány* 8: 945-956.
34. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953) "Field cancerisation" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*. 6: 963-968.
35. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759-76.
36. Ferekidis E., Nicolopoulos TP., Yiotakis J., Ferekidou E., Kandiloros D., Papadimitriou K., Tzangaroulakis A (2006) Correlation of clinical and surgical findings to histological features (koilocytosis, papillary hyperplasia) suggesting papillomavirus involvement in the pathogenesis of cholesteatoma. *Med Sci Monit*. 12 (9): 368-371.

37. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396: 643-649.
38. Yildirim MS., Ozturk K., Acar H., Arbag H., Ulku CH. (2003) Chromosome 8 aneuploidy in acquired cholesteatoma. *Acta otolaryngol*. 123: 372-376.
39. Treszl Andrea (2004) Eltérő biológiai viselkedésű humán melanomák genetikai jellemzése in situ hibridizációs módszerekkel. Egyetemi doktori értekezés. Kézirat: 4-5.
40. Lavezzi A., Mantovani M., Cazzullo A., Maturri L. (1998) Significance of trisomy 7 related to PCNA index in cholesteatoma. *Am J Otolaryngol*. 19(2): 109-112.
41. Ecsedi Sz. (2006) Eltérő biológiai viselkedést mutató cholesteatomák. Poszter.
42. Klenke C, Janowski S, Borck D, Ebmeyer J, Kalinowski J, Leichtle A. Identification of novel cholesteatoma-related gene expression signatures using full- genome microarrays. *Plos One*. 2012; E52718, 7:12 10.1371/journal.pone.0052718
43. Britze A, Birkler RID, Gregersen N, Ovesen T, Palmfeldt J. Large-Scale Proteomics Differentiates cholesteatoma from Surrounding Tissues and identifies novel proteins related to the pathogenesis *PlosOne* 2014;9(8):e104103.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104103>
44. Chung JH, Lee SH, Park CW, Kim KR, Tae K, Kang SH, Oh YH, Pyo JY (2015) Expression of apoptotic vs antiapoptotic proteins in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngology Head Neck Surg* 153: 1024-30.
45. Miyao m, Shinod H, Takahashi S (2005) Caspase-3, caspase-8, and nuclear Factor-kB expression in human cholesteatoma. *Otology and Neurotology*. 27: 8-13.
46. Olszewska E, Chodyncki S, Chyczewski L (2006) Apoptosis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 263: 409-413.

47. Ergün S, Carlsöö B, Zheng X (1999) Apoptosis in meatal skin cholesteatoma and squamous cell carcinoma of the ear. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 4: 280-285.
48. Mallet Y., Nouwen J., Lecomte-Houcke M., Desautly A. (2003) Agressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by MIB1. *Laryngoscope* 113: 328-331.
49. <https://www.creative-diagnostics.com/c-MYC-signaling-pathway.htm>
50. Jung P. (2007) Analysis of p53 and c-MYC two key transcription factors involved in tumorigenesis. PhD Dissertation.
51. Littlewood TD, Evan GI (1990) The role of myc oncogenes in cell growth and differentiation. *Advances in dental research* 4: 69-79.
52. Laurendeau IBI, Tozlu S, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. *Cancer Research.* 1999; 59(12):2759–2765.
53. Mertens F., Johansson B., Höglund M., Mitelman F. (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Research* 57:2765-2780.
54. Ozturk K, Yildirim MS, Acar H, Cenik Z, Keles B. Evaluation of c-MYC status in primary acquired cholesteatoma by using fluorescence in situ hybridization technique. *Otology & Neurotology.* 2006;27(5):588–591.
55. Holly A, Sittinger M, Bujia J. Immunohistochemical demonstration of c-MYC oncogene product in middle ear cholesteatoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 1995;252(6):366–369.
56. TP53 tumorszupresszor génmutáció vizsgálatok magyar tüdőrákos betegcsoportban

57. Kopper L., (2003) Apoptózis és a daganatok. Magyar Onkológia 47:123-131.
58. Albino AP., Reed JA., Bogdany JK., Sassoon J., Desloge RB., Parisier SC. (1998) Expression of p53 protein in human middle ear cholesteatomas. The American Journal of Otolaryngology. 19:30-36.
59. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R.(2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Biochem. 37:529–540
60. Gaston KE, Grossman HB. (2010) Proteomic assays for the detection of urothelial cancer. Methods Mol Biol. 641:303–323.
61. Gion M, Mione R, Barioli P, Sartorello P, Capitanio G (1994) Tissue polypeptide antigen and tissue polypeptide specific antigen in primary breast cancer. Evaluation in serum and tumour tissue. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 32:779-87.
62. Olszewska E, Lautermann J, KOc C, Schwaab M, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H (2005) Cytokeratin expression pattern in congenital and acquired pediatric cholesteatoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 262:731-736.
63. Frohwitter G, Buerger H, Van Diest PJ, Korsching E, Kleinheinz J, Fillies T (2016) Cytokeratin and protein expression patterns in squamous cell carcinoma of the oral cavity provide evidence for two distinct pathogenetic pathways. Oncology Letters 12:107–116
10.3892/ol.2016.4588
64. Kim HJ, Tinling ST, Chole RA. (2001) Expression patterns of cytokeratins in cholesteatomas: evidence of increased migration and proliferation. J Korean Med Sci.; 7:381–
8. 10.3346/jkms.2002.17.3.381

65. Ju JH, Yang W, Lee KM, Oh S, Nam K, Shim S, et al. (2013) Regulation of cell proliferation and migration by keratin 19- induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 19(16):4335–46. 10.1158/1078-0432.CCR-12-3295
66. Abbas O, Richards JE, YAar R, Mahalingam M (2011) Stem cell markers (cytokeratin 15, cytokeratin 19, and p63) in in situ and invasive cutaneous epithelial lesions. *Modern Pathology* 24:90-97.
67. Saha SK, Choi HY, Kim BW, Dayem AA, Yang GM, Kim KS, et al. (2016) KRT19 directly interacts with b-catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. *Oncogene.* pp.:1–18. 10.1038/onc.2016.221
68. Crowe DL, Milo GE, Shuler CF. (1999) Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential. *J. Dent. Res.* 78(6):1256–63. 10.1177/00220345990780061001
69. Van Blitterswijk CA, Grote JJ, Lutgert RW, Hesseling SC, Out CJ, Van Muijen GN, Fransen JA (1989) Cytokeratin patterns of tissues related to cholesteatoma pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 98:635-40.
70. Olszewska E, Sudhoff H. (2007) Comparative cytokeratin distribution patterns in cholesteatoma epithelium. *Histol Histopathol.* 22:37–42. 10.14670/HH-22.37
71. Min HJ, Park CW, Jeong JH, Cho SH, Kim KR, Lee SH. (2012) Comparative analysis of the expression of involucrin, filaggrin and cytokeratin 4,10,16 in cholesteatoma. *Korean J Audiol.* 16(3):124–129. 10.7874/kja.2012.16.3.124
72. Zhong LP, Chen WT, Zhang CP, Zhang ZY. (2007) Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104:377-84.

73. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. (2010) Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803:39-54.
74. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. (2001) Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol*. 22(10):571-579.
75. Visse R, Nagase H.(2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 92:827-839.
76. Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, Lindsey ML.(2012) The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.303: H919-H930.
77. Juhász A, Sziklai I, Rákossy Zs, Ecsedi Sz, Ádány R, Balázs M. (2009) Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9, correlates with the bone destruction capacity of cholesteatoma. *Otology and Neurotology*. 30:559–565. 10.1097/MAO.0b013e31819fe6ed
78. Wang H, Xu Z, Tang A, Su J.(2004) Detection of the activity of MMP2 and MMP9 in middle ear cholesteatoma *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*.18:620-2.
79. Kamp DW, Shacter E, Weitzman SA. (2011) Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology*. 25(5):400–413.
80. <https://www.genecards.org>
81. Mócsai G, Markó L, Remenyik É, Szegedi A (2012) A bőr barrier felépítése, különös tekintettel a keratinocytákra és a sejtközötti kapcsolatokra-Az atopiás dermatitis kialakulásában játszott szerepük. *Bőrgyógyászati és venerológiai szemle* 3:72-76.
82. Mohammadizadeh F, Naimi A, Rajabi P, Ghasemibasir H, Eftekhari A. (2009) Expression of basal and luminal cytokeratins in breast cancer and their correlation with

clinicopathological prognostic variables Indian J Med Sci. 63(4):152–62. 10.4103/0019-5359.50764

IX. Tárgyszavak / Keywords

Cholesteatoma

Quantitatív real time PCR

c-MYC

Citokeratin 1 / cytokeratin 1

Citokeratin10 / cytokeratin 10

Citokeratin 19 / cytokeratin 19

TP53

Mátrix metalloproteináz 9 / matrix metalloproteinase 9

X. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Penyige Andrásnak a Debreceni Egyetem Humángenetikai Tanszék egyetemi docensének, hogy lehetővé tette számomra az intézetben a kutatást, bevezetett az onkogenetikába. Külön köszönöm, hogy tanulhattam a kvantitatív PCR technika alapjait. Nagyon köszönöm, hogy mindvégig türelemmel és szeretettel irányította és segítette kutatómunkámat. Tőle kutatói szemléletet, precizitást, kitartást is tanulhattam. Tanulmányomat a Nemzeti Kutatási Alap (OTKA) segítségével anyagilag is támogatta.

Köszönet illeti Dr. Sziklai István professzor urat, aki figyelmemet a kutatásra irányította. Munkám egy részét segítő támogatásával a Debreceni Egyetem Fül-Orr-Gégszeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika OTKA1831 számú kutatási programjának részeként is végezhettem.

Köszönöm odaadó munkáját Kompár Csillának a Humángenetikai Tanszék munkatársának és Póliska Szilárdnak a Debreceni Egyetem Klinikai Genomikaközpont munkatársának, akik a kísérletek megtervezésében és kivitelezésében segítettek.

Külön köszönettel tartozom Dr. Tózsér József professzor úrnak, a Debreceni Egyetem Klinikai Genomikaközpont Igazgatójának hogy lehetővé tette az Intézetében a klinikai minták genetikai analízisét.

Köszönetet mondok Dr. Nagy Bálint professzor úrnak a Debreceni Egyetem Humángenetikai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette tanszékén a kutatásom elvégzését. Továbbá köszönöm a segítséget a Humángenetikai Tanszék valamennyi munkatársának.

XI. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/384/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Palkó Enikő
Neptun kód: B38JHW
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10070730

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Palkó, E.**, Pólska, S., Sziklai, I., Penyige, A.: Analysis of KRT1, KRT10, KRT19, TP53 and MMP9 expression in pediatric and adult cholesteatoma.
Plos One. 13 (7), 1-12, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200840>
IF: 2.776
2. **Palkó, E.**, Pólska, S., Csákányi, Z., Katona, G., Karosi, T., Helfferich, F., Penyige, A., Sziklai, I.:
The c-MYC Protooncogene Expression in Cholesteatoma.
BioMed Research International. 2014, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/639896>
IF: 1.579

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,355

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,355**

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, 2019.12.12.



XII. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények külön lenyomatait tartalmazza.