

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Dr. Palkó Enikő

Témavezető: Dr. Penyige András



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: dr. Palkó Enikő

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt-és molekuláris biológiájának programja) keretében

Témavezető: Dr.Penyige András PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA Doktora
tagok: Dr. Goda Katalin PhD
Dr. Drahos László PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára,
2020. szeptember 4. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Papp-Balogh Andrea PhD
Dr. Csősz Éva PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA Doktora
tagok: Dr. Papp-Balogh Andrea PhD
Dr. Csősz Éva PhD
Dr. Goda Katalin PhD
Dr. Drahos László PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2020. szeptember 4. 13 óra

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 medicinában számos keratinózus ciszta ismert, többek között az epidermalis ciszta (atheroma), és a cholesteatoma. A cholesteatoma a középfülben elhelyezkedő ectopiás keratinózus ciszta, melyet lokálisan invazivitás jellemez. Hisztológiailag a ciszta fala többrétegű elszarusodó laphám, melyet mátrixnak neveznek. A mátrix sejtei által termelt keratin, mely folyamatosan újratermelődik majd leválik, törmelék képez a ciszta belsejében, ezzel a cholesteatoma mérete nő, egyre kiterjedtebbé válik. Ebből a növekedéséből származik invazivitása, ami számos, különböző súlyosságú szövődményt okozhat a középfülben. Leggyakoribb a hallócsontláncolati destrukció, halláscsökkenés, fülfolyás, szédülés, és az intracraniális szövődmények. A cholesteatoma terápiája annak műtéti eltávolítása. Azonban még gondos sebészi eltávolítás után is a betegségnek magas a recidiva hajlama, főként a gyermekkori esetekben. Ezért gyógyítása 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 szövődmény nélkül gyógyul.

A cholesteatoma patomechanizmusa mai napig is csak részben ismert. A konvencionális elméletek alapján a cholesteatoma kialakulására az irodalomban számos teóriát találunk, melyek szerint a cholesteatoma kialakulása hátterében a középfül struktúrájára jellemző élettani és anatómiai viszonyok megváltozása áll. A cholesteatomának két etiológiai csoportját különböztetjük meg: congenitalis és szerzett formáját.

A legújabb tanulmányok a cholesteatomára jellemző irreguláris terjedés, proliferáció hátterében álló molekuláris és citogenetikai elváltozásokat vizsgálták, melyek azonosításával és analízisével pontosabb ismereteket kaptunk a cholesteatoma

kialakulására és viselkedésére vonatkozóan. Az eddig megjelent tanulmányok még mindig nem magyarázzák meg a betegség teljes patomechanizmusát.

A cholesteatoma kialakulásában, progresszivitásában szerepe van a cholesteatomára jellemző gyulladós folyamatnak. A mátrixban és a perimátrixban lévő immunsejtek (pl. monociták, makrofágok és leukociták) számos angiogenetikus faktort termelnek. (pl. VEGF, EGF, IL8, PDGF, COX2). Az angiogenetikus faktorok elősegítik az angiogenezist, ami lehetővé teszi a keratinociták migrációját, új erek képződését, a cholesteatoma növekedését. A mátrixban és a perimatrixban lévő gyulladós sejtpopulációk az angiogenezist reguláló faktorokkal együttesen fontos tényezők a cholesteatoma proliferációjában és agresszivitásában.

A cholesteatomában csontreszorpciós folyamat dominál, mely részben magyarázza a betegségben megfigyelhető oszteolízist. Számos, a cholesteatomában jelenlévő citokintről kimutatták, hogy segítik a csontreszorpciót (IL1, IL6, IL17, β -IFN). Továbbá a legújabb tanulmányok szerint a mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) kulcsszerepet töltenek be a cholesteatoma csontdestrukciós folyamatának mediálásában. Az extracelluláris mátrix lebontásában részt vevő MMP-k emelkedett szintje (például MMP1, MMP9, MMP10 és MMP12), általában mátrix metalloproteináz inhibitorok (TIMP-k) csökkent szintjével párosul.

A cholesteatoma invazivitása és agresszív viselkedése mögött számos kutató keresett genetikai eltéréseket cholesteatoma mintákban. Egy érdekes, de máig vitatott elképzelés, hogy a cholesteatoma egy alacsony grádusú neoplasztikus elváltozásnak tekinthető. Az utóbbi időben egyre több molekuláris szintű kutatási eredmény megkérdőjelezi a jóindulatú tumor helyénvalóságát.

A tumorokra jellemző genetikai abnormalitásokat különbözőféle molekuláris biológiai vizsgálatokkal lehet felderíteni. Ilyenek a konvencionális citogenetikai, áramlási citometriai, molekuláris genetikai és molekuláris citogenetikai vizsgáló eljárások. A molekuláris genetikai módszerek egyszerűbbé és olcsóbbá válása, a nagyfelbontású módszerek elterjedése lehetővé tette, a tumorok genomjának kromoszómális és génextpressziós eltéréseinek kimutatását.

Az irodalmi adatok elemzése alapján nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy családi halmozódás jellemezné a cholesteatoma kialakulását. Nincs egyértelmű genom instabilitás sem a cholesteatoma hátterében, viszont fluoreszcencia in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok segítségével számos kutatócsoport talált kromoszóma eltéréseket cholesteatomában. Ezek a kromoszóma vizsgálatok jó

támpontot adtak a cholesteatomában az adott kromoszómán lokalizált, sejtéresi, sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének vizsgálatához is.

A daganat kialakulás szükségszerűen a protoonkogén - és tumorszupresszor génexpressziós mintázatok megváltozásával jár. A daganatok keletkezésében a proapoptotikus aktivitás hiánya, vagy az antiapoptotikus hatás fokozódása is szerepet játszik. Ezek is zömmel génexpresszió-változás következményei, de előfordul, hogy a fehérjék működése változik meg poszttranszlációs mechanizmusok révén. Két irodalomban közölt „high throughput” microarray és proteomikai módszereket alkalmazó kísérletben több száz eltérően expresszálódó gént és fehérjét azonosítottak cholesteatoma mintákban (néhány példa: STS, CEACAM6, PRTN3, ELANE, MPO, MMP9, HTRA1, S100A7, S100A16/18, S100A7A, S100A12, S100A7, S100A8, S100A9, COL18A1, NID2, KRT4, KRT 7/8/19, PFN2LCN2, MMP1, MMP9, MMP10, MMP12, BCL2L1, S100A7, S100A9, PAX, SERPINB3, SERPINB4, KRT6 A/B, KRT18, KRT19, KRT8).

Slaughter és munkatársai ún. „field cancerization” elmélete szerint a tumorgenezis egy többlépcsős folyamat, külső karcinogén hatás által provokált sejt osztódási zavar. A cholesteatoma esetén extrinsic faktor a HPV16 jelenléte, valamint a cholesteatomára jellemző krónikus gyulladáshoz vezető folyamat lehet. A többlépcsős folyamat következtében számos onkogén „over expressziója” és tumorszupresszor gén expressziójának csökkenése figyelhető meg, így a sejtciklus és regulációja több ponton is károsodik. Ennek következtében genetikai eltérések (intrinsic factor) jönnek létre, ezzel tumorgenezist okozva.

A cholesteatoma gyermek és felnőttkori esetei jó modellrendszert képeznek a cholesteatoma kialakulásához hozzájáruló genetikai eltérések tanulmányozására, hiszen a nagyon hasonló szövettani szerkezetű daganatok részben eltérő biológiai viselkedést mutatnak a két korcsoportban. A felnőttkori cholesteatomákkal szemben a gyermekkori cholesteatomák sokkal agresszívebb viselkedésűek, hajlamosabbak a recidíva tumor kialakulására ezért a gyermekkori cholesteatoma minták lehetnek különösen alkalmasak az invazivitáshoz hozzájáruló molekuláris elváltozások tanulmányozására.

Munkánk során hat gén expressziós szintjének vizsgálatával, a cholesteatoma kialakulásában és progressziójában szerepet játszó gének azonosítását, pontosabb megértését kívántuk elérni.

Célkitűzések

Munkám során célom volt a cholesteatoma kialakulásának hátterében 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 recidívában feltehetően szerepet játszó gén azonosítása miatt.

Anyagok és módszerek

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 fiatalok esetében a gyermekek szülei írtak alá a beleegyző nyilatkozatot, hozzájárulván a minták felhasználásához. A vizsgálatokat a Helsinkai 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 26 cholesteatoma minta mellett 5 kontroll bőrmintát is gyűjtöttünk egészséges egyének retroauriculáris területéről.

Molekuláris genetikai módszerek

A teljes RNS készlet izolálása műtéti mintákból

A műtétek során eltávolított sebészeti mintákat RNA/ater™ (Thermo Fischer Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) RNS stabilizációs reagensben konzerváltuk, tipikusan 50 µL RNA/ater™ 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 szövetmintát vágunk vékony csíkokra, majd az RNA/ater™ 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 NanoDrop™ 1000A (Thermo Fisher Scientific, Woolston, Egyesült Királyság) spektrofotométer segítségével ellenőriztük. A kinyert RNS mennyisége átlagosan 0,4 µg/µL volt.

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 reakcióelegyet amit kiegészítettünk 2 µg RNS-el és nukleáz-mentes vízzel 20 µL végtérfogatra. 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.

Real-time (valós idejű) qPCR reakció

A célgénokről átíródott mRNS molekulák mennyiségét TaqMan alapú, kvantitatív valós idejű (real-time) 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 elnevezésű termékeket használtunk. Az általunk felhasznált génspecifius 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.

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 szignifikans voltát az egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) nem-parametrikus változatának felhasználásával, a Kruskal–Wallis tesztel (K-W teszt) és a post hoc Dunn tesztel vizsgáltuk. Valamennyi teszt esetében szignifikancia szint $p < 0.05$ volt. Az ábrákon a Dunn teszt p értékeinek jelzésére a következő szimbólumokat használtuk: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Adatcsoportok páronkénti összehasonlításához a Mann-Whitney U tesztet használtuk. Egy adott gén hatásának nagyságát a Cohen-féle d értékkel jellemeztük.

Eredmények

Klinikai adatok

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.

A cholesteatoma terjedését vizsgálva klinikai adatokból megállapítható volt, 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 hallócsontláncolati destrukció volt, 2 esetben ép volt a hallócsontláncolat. A gyermekkori cholesteatomákban nagyobb arányban fordult elő a recidiva, mint felnőttkorban.

A célgének expressziós mintázatának elemzése cholesteatoma mintákban

A c-MYC gén expressziója

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 azzal hasonló szöveti felépítésű, de eltérő viselkedésű cisztában, az atheromában is megmértük a c-MYC expressziót.

A cholesteatoma betegcsoportot felosztottuk gyermekkori (életkor <18 év) és

felőttkori (életkor>18 év) csoportokra. A klinikai adatok alapján mind a két korcsoportot tovább kategorizáltuk szerzett (nem recidiváló, egyszeri) és recidiváló csoportokra.

A c-MYC expresszió minden mintában alacsonynak tekinthető. Nincs szignifikáns különbség a kontroll és a benignus atheroma minták expressziós értékei között. A cholesteatomában mért mRNS expressziós értékek viszont szignifikánsan magasabbak mind a kontroll, mind az atheroma expressziós értékeinél. A gyermekkori mintákból mért normalizált expressziós értékek magasabbak, mint a felőttkori mintákból mért mRNS szintek. A többszörös mintavétel korrekciója esetében szignifikáns különbség csak a kontroll és a gyermekkori cholesteatoma értékek között volt. Ha külön-külön hasonlítjuk össze a két cholesteatoma csoportot a kontroll csoporttal, akkor mindkét cholesteatoma (gyermek és felőttkori) csoport expressziós értékei szignifikánsan magasabbak a kontrollénál. A gyermek és felőttkori cholesteatomákat tovább kategorizáltuk előfordulás gyakoriság szerint, a legmagasabb érték a gyermekkori recidíva csoportban volt detektálható. Nagy valószínűséggel az alacsony mintaszámok és a többszörös tesztelés korrekciója miatt egyik betegcsoport sem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll értékekhez képest, de ha egyenként hasonlítottuk össze a négy betegcsoport expressziós értékeit a kontroll értékeivel, akkor mind a két gyermekkori betegcsoport szignifikánsan magasabb expressziós szintekkel rendelkezett a kontrollokénál.

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.

A teljes cholesteatoma csoportban a KRT10 expresszió alacsonyabb, mint a kontroll bőr mintákban, de a különbség nem szignifikáns. RT-PCR adataink értékelése azt mutatta, hogy az mRNS expresszió szignifikánsan különbözött a kontroll és a stratifikált cholesteatoma csoportok között. A KRT10 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt a kontroll mintákban a felőttkori recidiváló

csoportéhoz képest. A gyermekkori recidiváló esetekben a KRT10 expressziója szintén szignifikánsabb magasabb volt, mint a felnőttkori recidiválóban.

A KRT19 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

A KRT19 minden mintában gyengén expresszálódik és expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést, a kontrollként használt normál bőr és a cholesteatoma csoport mintái között. Ha a cholesteatoma mintákat csoportbontásban vizsgáljuk és így hasonlítjuk az expressziós értékeket a kontroll értékekhez, akkor megfigyelhető, hogy a két recidiváló csoportban detektáltunk alacsony expressziós szinteket.

A MMP9 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

Az MMP9 esetében az mRNS expresszió szintje szignifikánsan emelkedett volt a cholesteatoma mintákban a normál bőrhez viszonyítva. A cholesteatoma minták egyszeri előfordulás és recidíva csoportokra bontása esetén a szignifikáns különbség a kontroll és recidíva csoportok között maradt meg. A legmagasabb MMP9 expressziót felnőtt-és gyermekkori recidiváló mintacsoportban mértük, a legalacsonyabbat a felnőttkori nem recidiváló csoportban. 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.

A TP53 gén expressziójának vizsgálata cholesteatoma mintákban

A TP53 gén expressziója magasabb volt a recidiváló esetekben, mint a nem recidiváló esetekben. Azonban a csoportok mRNS expressziós értékei között nem volt szignifikáns különbség. A legmagasabb TP53 expressziót a négy cholesteatoma

csoport közül a recidiváló gyermekkori cholesteatoma mintákban detektáltuk, valamivel alacsonyabb értékeket mértünk a felnőtt nem recidiváló csoportban.

Esettanulmány

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

Megbeszélés

Eredményeink megerősítik az irodalomban már leírt, a gyermek és felnőttkori cholesteatomás betegek eltérő sajátosságait és egyben új adatokat szolgáltatnak a cholesteatoma kialakulásában és progressziójában feltehetően szerepet játszó, általunk vizsgált hat gén expressziójában bekövetkező változásokról, genetikai eltérésekről.

A c-MYC, KRT1, KRT10, KRT19, MMP9 és TP53 gének expressziójának kvantitatív mérését végeztük el cholesteatomás betegek műtéti mintáiban RT-QPCR módszer alkalmazásával. Retroauricularis régiójából származó normál bőrmintákat használtunk kontrollként minden méréshez. A c-MYC expressziót a cholesteatomához hisztológiailag nagyon hasonló atheroma mintákban is megmértük.

Eredményeink azt mutatják, hogy a cholesteatoma mintákban a c-MYC protoonkogén eltérő expressziót mutat a benignus atheroma és kontroll mintákhoz képest. Ezen megfigyelés alapján feltételezzük, hogy a cholesteatomában a c-MYC emelkedett expressziója megváltozott sejtciklus regulációt okoz. A gyermekkori cholesteatomás esetekben detektált magasabb c-MYC szint összefüggésbe hozható az ebben a korcsoportban észlelt recidiva hajlammal.

Sikerült kimutatnunk a citokeratin fehérjék expressziós mintázatának eltéréseit a kontroll mintákéhoz képest. Cholesteatoma mintáinkban mind a KRT1 mind a KRT10 gén azonos expressziós mintázatokat mutatott. 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 differenciálódási és keratinizációs folyamatra utal, ami adataink szerint fokozottabb a gyermekkori recidiváló esetekben. A KRT1 és a KRT10 szignifikánsan csökkent expressziója figyelhető meg a felnőttkori recidiváló cholesteatomás csoportban a

gyermekkori recidiváló esetekhez képest, amely a keratinociták proliferációs-differenciálódási egyensúlyának eltolódását jelzi a dedifferenciálódás felé.

Különösen érdekesnek, fontosnak tűnik a KRT19 gén expressziójában látható különbség. Feltételezhetően a KRT19 expresszió prognosztikai faktorként is használható lenne a cholesteatoma klinikai viselkedésének, recidiva hajlamának előrejelzésében.

Kutatási 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. Génexpressziós méréseink eredményei alapján az megállapítható, hogy az MMP9 gén expressziós szintje arányos a csontdestrukcióval és a cholesteatoma invazivitásával. Feltételezésünk szerint, a megnövekedett c-MYC protoonkogén okozhatja a megnövekedett MMP9 expresszióját azáltal, hogy a c-MYC kötőhely jelen van a MMP9 gén promoter régiójában.

A TP53 gén esetében nem volt szignifikáns különbség a cholesteatoma és kontroll minták között, de kissé emelkedettebb expresszió volt megfigyelhető a recidiváló mintákban. Feltételezhetően, a c-MYC transzkripció faktor emelkedett szintje lehet a recidiváló esetekben tapasztalt emelkedett TP53 expresszió oka.

Kísérleteink időtartama alatt lehetőségünk volt elvégezni egy betegből származó primer és recidiváló minták genetikai analízisét, a két mintában mért génexpressziós szint változások jól reprezentálják fenti megállapításainkat.

Összefoglalva megállapítható, hogy a különböző korban kialakuló és eltérő recidiva hajlammal rendelkező cholesteatomák eltérő génexpressziós mintázatot mutatnak progressziójuk során.

A szövettanilag hasonló, de klinikai adatok alapján alkotott gyermek és felnőttkori cholesteatomás csoportokban számos hasonlóságot és szembetűnő különbözőséget fedeztünk fel a vizsgált gének - c-MYC, KRT1, KRT10, KRT19, MMP9, TP53 - expressziós mintázatában. Ez reményeink szerint lehetővé teszi számunkra, hogy pontosabban megértsük a cholesteatoma kialakulásában és növekedésében szerepet játszó molekuláris tényezők szerepét. Kutatásunk eredményei részben alátámasztják a cholesteatoma neoplasztikus malformációjának valószínűségét.

A PHD értekezés új eredményei

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, a KRT1/10, a KRT19, a MMP9 és TP53 gének expressziós mintázatát kvantitatív real time PCR segítségével. Ez a vizsgálat lehetővé tette a gének expressziójának mennyiségi analízisét, ezzel pontosabban meg tudtuk határozni az általunk vizsgált hat génnek 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 recidiva hajlam szerint kategorizált betegeknél a c-MYC, a KRT1/10, a KRT19, a TP53 és a 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 ismertett esettanulmány pontosítja a recidiváló esetekre jellemző genetikai eltéréseket, melyek befolyásolják a fokozottabb sejtaktivitást, invazivitási potenciált, és melyek rosszabb prognózist valószínűsítenek.

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények



**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.**, Póliska, 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.**, Póliska, 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.



