

# A petefészekdaganatok prognózisának előrejelzése microarray génexpressziós adatok felhasználásával

Doktori tézisek

**Dr. Fekete Tibor**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Doktori Iskola vezetője: Dr. Kopper László, egyetemi tanár, az orvostudományok doktora I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet.

Témavezető: Dr. Gyórfy Balázs, tudományos főmunkatárs, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Lacza Zsombor, PhD, SE Élettani Intézet  
Dr. Gundy Sarolta, PhD, Országos Onkológiai Intézet

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó András, az MTA doktora, SE II. Sz. Gyermekklinika

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tiba János, PhD, Főv. Önk. Uzsoki utcai Kórház  
Dr. Hauser Péter PhD, SE II. Sz. Gyermekklinika

Budapest

2012

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A petefészek tumorok

A petefészek tumorok a női daganatok legrosszindulatúbb csoportját alkotják. A nőknél ez a nyolcadik leggyakrabban előforduló daganat. Európában közel 43.000, az Egyesült Államokban közel 22.000 új daganatos megbetegedést ismernek fel évente. Magyarországon évi 1200 új daganatos megbetegedéssel és 600, a daganat következtében kialakult halálesettel számolhatunk. Bár az elmúlt évtizedekben a kezelés hatékonysága fokozatosan javult, a kezelést követő 5 éves túlélés még mindig 30% alatt marad.

A petefészek daganatai klinikailag nagyon hasonló megjelenésűek, tüneteizgények, sokféle nem daganatos betegséget is utánozhatnak. Ez megnehezíti a diagnózis felállítását. Sokféleségük annak köszönhető, hogy olyan sejtekből indulnak ki, amelyek nagyon változatos szöveti szerkezetté tudnak differenciálódni. A daganatok nemcsak szövettanilag sokfélék, hanem morfológiailag (cystikus és solid tumorok) és funkcionálisan (hormontermelő és hormonálisan inaktív daganatok) is.

A daganat gyanúja tulajdonképpen műtéti javallatot jelent, mivel csak a szövettani vizsgálat ad biztos diagnózist. Mivel ma még nem ismerünk egyetlen rákmegelőző állapotot sem, melyre hatékony szűrőprogramot lehetne építeni, csak a daganat minél korábbi stádiumban való felismerésétől, illetve a kezelések hatékonyabbá tételétől várhatunk kedvezőbb eredményeket.

### 1.2. Szövettani típusok

Az ovárium daganatok szövettani klasszifikációja, a WHO ajánlása szerint, figyelembe veszi a daganat kiindulási helyét. E szerint megkülönböztetünk felszíni (coeloma v. germinális) hám, ivarléc (sex cord), csírasejt, illetve speciális ovariális stroma kiindulású tumorokat.

A klinikumban a petefészek valódi daganatainak 80-90%-a indul ki az embrionális coelomahám multipotens sejteiből származó ovariális felszíni hámból, illetve a felszíni hám stromába nyomult apró inclusiós cystáiból. Az epitheliális daganatok közül leggyakrabban serosus, mucinosus, endometroid és ritkán világos sejtes (clear cell) carcinomával találkozunk.

Biológiai viselkedésüket és szövettani képüket tekintve a daganatok lehetnek benignusak, malignusak, és borderline (low malignant potential – LMP) tumorok.

### 1.3. A tumorkeltekzés folyamata

A genomikus vizsgálatok azt mutatják, hogy mucinosus adenocarcinomák, a borderline tumorok és benignus cystadenomák genetikai összetétele rendkívül

hasonlít egymásra. E mellett a K-RAS mutációk specifikusak a borderline tumorokra, a low-grade tumorokra, valamint a mucinosus adenocarcinomákra. A fenti megállapításokból kézenfekvően következik, hogy a karcinogenezis inkább az adenoma – borderline tumor – invazív adenocarcinoma vonalat követheti.

## **1.4. Petefészekrák kezelése**

### **1.4.1. Műtéti kezelés**

Az ovárium tumorok elsődleges kezelése sebészi. A műtéti beavatkozás célja egyrészt a stádium pontos megállapítása, a tumor maximális eltávolítása, valamint szövettani vizsgálatra anyagminta vétele.

A műtét típusa transzabdominalis hysterectomia kétoldali adnexectomiával és csepsz resectióval, ettől csak kivételes esetekben lehet eltérni. Amennyiben cél a fertilitás megőrzése, és a daganat csak az egyik petefészekben található meg, továbbá a sebészi staging a hasban sehol máshol nem igazol daganatot, akkor szóba jön az egyoldali adnexectomia is.

### **1.4.2. Kemoterápia**

Ia és Ib grade 1 típusú daganatoknál önmagában elégséges a sebészi kezelés. Ezeknél magasabb stádiumú betegségek esetében mindenképpen javasolt az intravénás vagy intraperitoneális adjuváns kemoterápiás kezelés.

Minden hámeredetű ovárium tumoros betegnél a taxol-platina alapú kombinált kemoterápia az elsőként választandó kezelés (Ib szintű evidencia, A-típusú ajánlás) ennek formája tartalmazhat paclitaxel-carboplatin, docetaxel-carboplatin vagy paclitaxel-cisplatin kombinációkat.

A kemoterápiás ciklusok számát elsősorban a daganat stádiuma határozza meg. Korai stádium esetén 3-6 ciklus, míg előrehaladottabb stádiumban 6-8 kezelési ciklus ajánlott. Tumormarkert termelő daganatok esetén a negatív marker szint elérése után még két ciklus adása ajánlható. Amennyiben a daganat tumormarkert nem termel, úgy a kemoterápiás kezelés megkezdése előtt elvégzett CT lelet eredményét hasonlítjuk össze a 6. kezelés után végzett CT lelettel. A két érték alapján döntünk a további kezelésről (kezelés befejezése, folytatása, protokollmódosítás).

### **1.4.3. Hormonok**

Az ovárium tumorok csaknem 75%-a receptor pozitív, ezért a progesztagének, illetve az antiösztrogének potenciális alkotó elemei az ovárium daganatok kezelésének. Az ugyancsak megfigyelt androgén receptor pozitivitás további terápiás megfontolásokat vethet fel.

## 1.5. Az ovárium carcinomák prognosztikai faktorai

### 1.5.1. Klinikai paraméterek

A petefészekrákok 70%-a előrehaladott stádiumban (FIGO III-IV.) kerül felismerésre, prognózisuk ezért rossz, az átlagos túlélés 40-45%.

A legfontosabb prognosztikai faktor a tumor FIGO beosztás szerinti stádiuma. I. stádiumban az 5 éves túlélés 90-95%, II. stádiumban 70-75%, IIIa stádiumban 30-40%, IIIb stádiumban 20-30%, míg IIIc és IV. stádiumban 5% alatti. Az adatok az Egyesült Államok National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results adatbázisából származnak.

A prognózist befolyásolja az életkor, a fiatalabb korban előforduló tumorok prognózisa jobb. Befolyásoló tényező még a beteg általános állapota, testsúlya, a tumor szövettani típusa, a differenciáltság foka (grade), a cytoreductív műtétet követően visszamaradt reziduális daganat mérete, a cytostaticumokkal szembeni rezisztencia mértéke, valamint az ascites jelenléte. Az aneuploid tumorok prognózisa általában rosszabb.

### 1.5.2. A petefészekrák génexpresszió alapú biomarkerei

Feltételezték, hogy petefészekrákból készített génexpressziós vizsgálatokkal nemcsak azonosítani lehet a hibásan működő géneket, de ezeket a géneket molekuláris markerként is fel lehet használni a betegség viselkedésének leírására. A hibásan működő géneken keresztül meghatározhatjuk a betegség molekuláris karakterisztikáját, megérthetjük a betegség kifejlődését, és ezen keresztül új módszereket fejleszthetünk ki a betegség felismerésére, illetve célzott kezelésére. A génexpressziós analízissel azonosítani lehet a petefészekrák karcinogenezisét, különböző szövettani szubtypusait, a kezelésre adott választ, a prognózist és a progressziót.

A klinikai gyakorlatban azonban a monogénes markerek felhasználása könnyebben megvalósítható. Ezeket tumormarkerként lehet használni, amelyekkel a betegség nyomonkövetése is megoldható. Ezek közül a klinikai gyakorlatban a Ca-125, valamint a HE4 használata terjedt el.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Régóta feltételezik, hogy egy sejt, vagy szövet génextpressziós mintázata egyértelműen meghatározza a sejt, illetve a szövet biológiai viselkedését. Ugyanezt feltételezzük daganatok esetében is, tehát ha meghatározzuk a daganatszövetben jelen lévő aktivált géneket, ezek alapján meg tudjuk mondani a daganat szövettani felépítését, biológiai viselkedését, a klinikai kezelésre adott válaszát, valamint előre tudjuk jelezni a betegség lefolyását, esetleges túlélését. Munkámban célom volt ezeket a géneket meghatározni petefészekrák esetében.

A daganatszövetekben meg lehet határozni az összes aktív gént is, de ez rendkívüli anyagi ráfordítást igényel. Ahhoz, hogy a klinikumban ésszerű keretek között lehessen genetikai vizsgálatokat végezni, meg kell határozni azokat az úgynevezett csúcsgéneket, amelyek génextpresszióját érdemes vizsgálni a daganatszövetben. Ennek meghatározására két útvonalon indultam el. Először is léteznek olyan nyilvános génbankok, melyek tudományos kutatás céljára hozzáférhetővé teszik különböző normál szövetekből és betegségekben, köztük petefészekrákból származó minták teljes génextpressziós vizsgálatának eredményeit, a pontos szövettani típusát, illetve számos esetben hozzáférhető még a mintához tartozó klinikai adatok is, például a betegség kezelése, illetve a daganat kezelésre adott válasza, a beteg túlélése is. Ezeket az adatokat megkerestem, illetve táblázatos formátumban letöltöttem.

E mellett az irodalomban vannak tanulmányok, melyek konkrét gének expresszióját vizsgálták petefészekrák esetében. Ezeket a tanulmányokat megkerestem, és összehasonlítottam a leírt géneket a nyilvános génbankokból származó adatokkal.

A fenti két módszer alapján kigyűjtött adatokat a megfelelő statisztikai módszerekkel feldolgoztam, és minden esetben meghatároztam azokat a csúcsgéneket, melyek a legnagyobb valószínűséggel határozzák meg a daganat viselkedését.

A meghatározott csúcsgéneket ezt követően klinikai mintákon teszteltem. Petefészekrákból származó szövetmintákat gyűjtöttem az I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán, valamint az Országos Onkológiai Intézetben. Összegyűjtöttem a mintákhoz tartozó klinikai adatokat is. Ezt követően megvizsgáltam, hogy a korábban meghatározott csúcsgéneknek tényleg igazolható-e szerepe a klinikai mintákban is.

Összefoglalva vizsgálataim során a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Az irodalomban leírt a **petefészekrák szövettani osztályozásával** összefüggésbe hozott génlisták közül melyik képes független adathalmazokon is hatásos osztályozásra?

2. Az irodalomban leírt a **petefészekrák prognózisával** összefüggésbe hozott génlisták közül melyik képes független adathalmazokon is határos osztályozásra?
3. Daganatos petefészek szövetminták microarray alapú génextpressziós mintázatának elemzésével azonosítani lehet-e olyan géneket, amelyek **expressziója összefüggésben van a betegség progressziójával?**
4. Daganatos petefészek szövetminták microarray alapú génextpressziós mintázatának elemzésével azonosítani lehet-e olyan géneket, amelyek **expressziója összefüggésben van a tumor szövettani típusával?**

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. Microarray rendszerek

Munkám során génextpressziót vizsgáltam, amely a microarray technikán alapul. A DNS/RNS szálakon elhelyezkedő nukleinsavak, a nukleotid bázispárok keresztül hidrogénkötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Minél több bázispár egyezik meg egymással két nukleinsav láncon, annál erősebb kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Ha fluorescensen jelölt cél-szekvenciákat kapcsolunk a mintákhoz, meg tudjuk határozni azokat a helyeket, ahova a DNS/RNS szálak kötődnek, illetve a mintában lévő DNS/RNS mennyiségére is kaphatunk információt.

A microarray technikánál az oligonukleotid cél-szekvenciák egy szilárd felszínre, általában szilikon alapú felszínre csatlakoznak (ezt nevezzük gén chip technológiának). Az egyes „helyek” (spot) picomolnyi specifikus DNS/RNS szekvenciát tartalmaznak, ezeket próbáknak (probe) nevezzük. A próba tulajdonképpen egy génnek egy rövid szakasza, mely hibridizálni képes a specifikus génnel. Ezzel lehetőség nyílik az adott gén azonosítására. Egy szilikon felszínre gyakorlatilag bármennyi oligonukleotid próbát fel lehet vinni, ezzel egymással párhuzamosan több gén vizsgálatára is lehetőség nyílik.

#### 3.1.2. GEO: microarray lerakatok

Gene expression omnibus vagy rövidítve GEO az Egyesült Államokban működő [National Center for Biotechnology Information](#) (NCBI) által létrehozott nyilvános génbank. A GEO, több független kisebb laboratórium mellett, az európai székhelyű [European Molecular Biology Laboratory](#) (EMBL) és a japán [DNA Data Bank of Japan](#) (DDBJ) adatbázisát is koordinálja. A laboratóriumok adatbázisa elektronikusan össze van kötve, melyet napi szinten frissítenek. 2011 áprilisában 135.440.924 génszekvenciát tartalmazott, ezek között különféle fajok, így az ember génállománya, illetve normális és mindenféle betegségből, köztük tumoros szövetekből származó minták teljes génextpressziós mintázata is elérhető. A minták

mellett sokszor elérhető az ehhez tartozó klinikai adatbázis is, bizonyos esetekben a betegség kezelése és kimenetele is nyilvános.

### 3.1.3. Microarray adatbank felépítése

A vizsgálat kezdetén szükséges volt egy elegendően nagy, génexpressziós és klinikai adatokat tartalmazó adatbank felépítése. Ehhez szisztematikusan átvizsgáltam a Pubmed (<http://www.pubmed.com>) és a GEO adatbázist (Gene Expression Omnibus) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). A felhasznált keresőszavak a következők voltak: “ovarian”, “normal”, “cancer” and “GPL96” and “GPL570” (ezen utolsó kettő az Affymetrix HGU133A és HGU133A+2 microarray platformok hozzáférési nevei). Csak azokat a tanulmányokat használtam fel, ahol hozzáférhetőek voltak az eredeti, nyers microarray adatok és a klinikai adatok is.

### 3.2. Statisztikai analízis

A letöltött nyers microarray adatokat MAS 5.0 algoritmussal normalizáltam az R statisztikai környezetben (<http://www.R-project.org>), amihez a Bioconductor Affy csomagját használtam fel (<http://www.bioconductor.org>). Ezután a GPL570-es microarray platformot összefésültem a GPL96 platformmal. Ehhez a Netaffx analízis centrum (<http://www.affymetrix.com>) microarray táblázatait használtam (mivel a GPL570-es platform valamennyi GPL96-os próbát tartalmazza, az összefésülés során lényegében a GPL96-on nem szereplő próbákat távolítottam el a GPL570-es mintákból).

Ezt követően a génexpressziós adatokat a BRB-ArrayTools 3.7.0 (Dr. Richard Simon és Amy Peng Lam által fejlesztett, kutatási célra ingyen hozzáférhető statisztikai program, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) programba importáltam. A génhalmazok összehasonlítását elvégeztem a különböző szövettani típusokra, valamint a normális petefészek szövetre is. A szignifikancia szintjét 0,01-ben határoztam meg. A vizsgálat eredményeképpen egy rangsort kaptam a teljes genetikai állományra nézve, amely megmutatja, hogy melyik gének a legfontosabbak a petefészekrák kialakulása szempontjából.

### 3.3. Klinikai mintagyűjtés

A validációs vizsgálathoz petefészekrákból származó szövettani mintákat gyűjtöttem a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján, valamint az Országos Onkológiai Intézet Nőgyógyászati Osztályán. A mintagyűjtéseket az intézmények etikai bizottsága felügyelte. Petefészekrákra gyanús betegeknél a műtét kapcsán eltávolított ováriumokból kb. 1 cm<sup>3</sup>-es mintát vettem. A nyert anyagokat az eltávolításukat követően azonnal -80 °C-ra hűtöttük le, és ezen a hőmérsékleten tároltam az RNS izolálásáig.

2000 és 2005 között összesen 124 petefészekrákból származó mintát gyűjtöttem össze. Ezekből csak azokat a mintákat és klinikai adatokat használtam fel, amelyeknél kiváló minőségű RNS-t sikerült izolálni, valamint a szövettani vizsgálat egyértelműen petefészekből származó daganatot igazolt. A fenti kritériumok figyelembe vételével 64 használható mintát kaptam.

### **3.4. RNS izolálás és minőségi kontroll**

Az RNS-t Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével izoláltam. A mintákat lizáltam és homogenizáltam 300µl GITC tartalmú lízis pufferrel és 3µl β-mercaptoethanol tartalmú oldattal. Az így nyert mintát Polytron homogenizátorral centrifugáltam 30-40 másodpercig, majd Proteinase K oldattal emésztettem 55 °C-on 10 percen keresztül. Az oldatot szilikon membránon átszűrtem, majd DNase I. kezelésnek vettem alá, hogy teljes egészében eltávolítsam belőle a genomikus DNS-t. A nyert RNS-t feloldottam 50 µl RNáz-mentes desztillált vízben.

A mennyiségi és minőségi analízist Nanodrop1000-es készülékkel (BCM, Houston, TX, USA) és gélelektroforézissel végeztem (Agilent Bioanalyzer System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Az RNS A260 és A280 fehérjekoncentrációt és ezek arányát, vagyis a minta tisztaságát ugyancsak megmértem. Csakis a jó minőségű, sérülésmentes RNS-t tartalmazó mintákat fogadtam el, melyek normális 18S és 28S riboszomális RNS csfkokat mutattak a Bioanalyzer analízissel. A nyert RNS-t -80 °C-ra fagyasztottam le az RT-PCR mérések elvégzéséig.

### **3.5. TaqMan RT-PCR mérések**

TaqMan real-time PCR méréseket végeztem az előzetesen kiválasztott 40 gén expressziós mintázatának meghatározására. A méréseket Micro Fluidic Card System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztem. A 40 vizsgált gén között szerepet kaptak a túlélés előrejelzésében és a szövettani típus meghatározásában szerepet játszó gének is. Vizsgáltam még a kemoterápiás rezisztencia kialakulásában szerepet játszó géneket (tubulinok és ABC transzporterek), az emlőrák kialakulásáért felelős géneket (mammaglobin-A és synuclein gamma), valamint két housekeeping gént, amelyek a későbbi minőségi kontroll szempontjából voltak fontosak. A housekeeping gének meghatározására azért volt szükség, mert ezeknek minden élő sejtben működniük kell. Hiányukban a sejt elpusztul, így meghatározásuk kontrollként szerepel a tanulmányban. A méréseket az ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System segítségével végeztem, a készülék technológiai leírásának megfelelően.



### 3.6. A RT-PCR mérések adatainak feldolgozása

A mérési adatok feldolgozására az Applied Biosystems által fejlesztett SDS 2.2 szoftvert használtam. A kivont delta Ct értékeket a klinikai adatok szerint csoportokba rendeztem és párosítottam őket. (A delta Ct érték az adott génextpresszióra normalizált érték, mely a mintában található riboszomális 18S és RPLP0 átlagos expressziójához került normalizálásra.) A klinikai adatokból a recidíva-mentes és teljes túlélést, valamint a szövettani típusokat használtam fel csoportosításra.

Ezt követően a két csoporton túlélési vizsgálatot (survival analysis) végeztem Significance Analysis of Microarrays (SAM) segítségével. Kaplan-Meier túlélési elemzést a WinSTAT 2007 for Microsoft Excel program (Robert K. Fitch Software, Germany) segítségével végeztem.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A microarray adatok meta-analízise

Összesen 829 petefészek-minta microarray adatait töltöttem le. Ebből 806 petefészekrákból származó minta (GSE9891, GSE14001, GSE2109, GSE6008, GSE14764, GSE3149 és GSE15578 adatbázisok), valamint 23 egészséges petefészekből származó minta (GSE15578, GSE14001, GSE3526, GSE1133, GSE2361, GSE7307 és GSE6008 adatbázisok) adatait használtam fel. A teljes normalizált adatbázis, mely tartalmazza a MAS5 expressziós értékeket és a mintákhoz tartozó klinikai adatokat, a [http://www.kmplot.com/ovar/@ovary\\_normalized.txt](http://www.kmplot.com/ovar/@ovary_normalized.txt) honlapon érhető el.

Ezen kívül felhasználtam a 38 korábbi petefészekrákkal kapcsolatban publikált génlistákat is. A génlistákat Affymetrix microarray adatokra konvertáltam (ehhez az Affymetrix által, a microarray-on levő próbák génekkel való kombinálására készített táblázatot használtam). Csak azokat a tanulmányokat használtam fel, ahol a gének legalább 50%-át meg lehetett feleltetni Affimetrix próbáknak (n=16). A tanulmányokból kapott génlistáknál megnéztem, mennyire képesek előre jelezni független analízissel a különbséget normális és daganatos folyamat között, illetve a különböző szövettani típusok között. P<0.005-es szignifikancia értéknél összesen nyolc publikációból származó génlistát találtam alkalmasnak a fentiek elkülönítésére.

Túléléssel kapcsolatos adatokat két korábbi tanulmányban találtam (GSE3149 és GSE14764). Ezek összesen 199 mintát tartalmaznak. A korábban publikált génlisták egyike sem volt képes szignifikánsan előre jelezni a túlélést ezekben a betegekben.

A letöltött és összekombinált microarray adatbázisok alkalmasak voltak a túlélést és szövettani típust meghatározó gének elkülönítésére.

A meta-analízis alapján a serous carcinoma elkülönítésére alkalmas gének a következők: **TSPAN8** (tetraspanin 8), **WT1** (Wilms tumor 1), **NPR1** (natriuretic peptide receptor A), **MSLN** (mesothelin), **GAS1** (growth arrest-specific 1), **MUC16** (mucin 16), **SPON1** (spondin 1), **LYPD1** (LY6/PLAUR domain containing 1).

Az endometroid carcinomát a **WT1** (Wilms tumor 1), **GAS1** (growth arrest-specific 1), **IGF2BP2** (insulin-like growth factor 2), **ARHGAP29** (Rho GTPase activating protein 29), **GAS6** (growth arrest-specific 6), **MSLN** (mesothelin), **SCGB2A1** (secretoglobin, family 2A), **MLPH** (melanophilin) gének segítségével azonosíthatjuk.

A világosejtes carcinomát a **PBX1** (pre-B-cell leukémia homeobox 1), **MEIS1** (Meis homeobox 1), **CLIC5** (chloride intracellular channel 5), **CXADR** (coxsackie vírus receptor), **WT1** (Wilms tumor 1), **TCF7L2** (transcription factor 7-

like 2), **FXYD2** (FXYD domain containing ion transport regulator 2), **SLC3A1** (solute carrier family 3 member 1) génekkel mutathatjuk ki.

Valamint a mucinosus carcinomát az **EMX2** (empty spiracles homeobox 2), **CHI3L1** (chitinase 3-like 1), **PAX8** (paired box 8), **TFF1** (trefoil factor 1), **SPINK1** (serine peptidase inhibitor, Kazal type 1), **CEACAM6** (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6), **TFF3** (trefoil factor 3) gének megjelenése jellemzi.

A statisztikai analízis során a petefészekrák túlélésének előrejelzésére alkalmas géneket jelentőségük szerint sorrendbe állítottam. A legfontosabb 15 gén sorrendben a következő: **PRPS2** (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2), **ZYX** (zyxin), **DOPEY2** (dopey family member 2), **PHF1** (PHD finger protein 1), **HSDL2** (hydroxysteroid dehydrogenase like 2), **FANCL** (Fanconi anemia, complementation group L), **LYPLA2** (lysophospholipase II), **MYO9B** (myosin IXB), **HGDFRP3** (hepatoma-derived growth factor, related protein 3), **MYRIP** (myosin VIIA and Rab interacting protein), **220388\_at** (nincs neve), **GIPC1** (GIPC PDZ domain containing family, member 1), **REST** (RE1-silencing transcription factor), **ARMCX1** (armadillo repeat containing, X-linked 1), **CTNNA1** (catenin, alpha-like 1).

#### 4.2. Klinikai adatok feldolgozása

A klinikai adatokból vizsgáltam a daganat szövettani típusát, a betegség stádiumát, a daganat differenciáltsági fokát (grade), a recidíva kialakulását, a recidíva-mentes túlélést, az összesített túlélést, az alkalmazott kemoterápia típusát, valamint a másodlagosan kialakuló emlőrákot.

A betegek átlagos életkora  $60 \pm 11$  év volt. Az átlagos recidíva-mentes túlélés 24,5 hónap volt. Összesen 31 recidíva volt. Beteganyagunkban az átlagos túlélés 29 hónap volt (23 halálesettel). Negyvennégy betegnél alacsony differenciáltságú serosus, háromnál magas differenciáltságú serosus daganatot, hat esetben határeset (borderline) serosus tumort találtunk. Négy betegnél alakult ki a kezelést követően másodlagos emlőrák.

#### 4.3. TaqMan RT-PCR mérések

Tanulmányom egyik célja volt a meta-analízis által meghatározott legfontosabb gének tesztelése TaqMan analízis segítségével klinikai mintákon. A meta-analízis segítségével meghatározott csúcs-gének mellett az irodalomban fellelhető petefészekrákkal kapcsolatos géneket is teszteltem.

A kiválasztott gének expresszióját három fő szempont köré csoportosítottam. Ennek megfelelően a túlélést meghatározó gének, a szövettani típust meghatározó gének és a kezelést követően másodlagosan kialakuló emlőrákért felelős gének kerültek független analízisre. A viszonylag alacsony klinikai

mintaszám miatt csak a high-grade serosus szövettani típust tudtam összehasonlítani az összes többi szövettani típusból képzett csoporttal. A klinikai változókból egyedül a daganat stádiumát lehet összefüggésbe hozni a túlélési adatokkal ( $p=0,02$ ).

A magas malignitással rendelkező serosus ovárium carcinomát klinikai mintákon is egyértelműen azonosítani lehet a következő génekkel: **GAS1** (growth arrest-specific 1 fehérje), **WT1** (Wilms tumor 1), **MSLN** (mesothelin), **NPR1** (natriuretic peptide receptor A/guanylatecyclase A), **TSPAN8** (tetraspanin 8), **ARHGAP29** (Rho GTPase activating protein 29), **MUC16** (mucin 16, cell surface associated), **ZYX** (ESP-2, HED-2), **MYO9B** (myosin IXB), **SNCG** (synuclein, gamma/breast cancer-specific protein 1), **TUBB1** (tubulin, beta 1), **MAP4** (microtubule-associated protein 4), **TUBA1B** (tubulin, alpha 1b).

Vizsgálataim alapján a **TOP2A** gén (topoisomerase (DNS) II alpha) képes elkülöníteni a magas malignitású serosus tumort az alacsony malignitású borderline daganattól.

#### 4.4. Túlélési elemzések

A túléléssel kapcsolatos géneket Kaplan-Meier survival plots analízissel dolgoztuk fel. Az adatfeldolgozásban az átlagos génexpresszió szempontjából két csoportot különítettünk el. Az egyik csoportot az átlagosnál alacsonyabb génexpresszió, a másik csoportot az átlagoshoz képest magasabb génexpresszió minták alkották. Az adatelemzést elvégeztük a recidíva-mentes túlélésre és a teljes túlélésre is.

Az elemzés alapján az összesített túlélés szempontjából három gén, a **PGR** (progeszteron receptor), **ESR2** (ösztrogén receptor 2) és a **TSPAN8** (tetraspanin 8) bizonyult meghatározónak.

A recidíva-mentes túlélést a **MAPT** (microtubule-associated protein tau) és a **SNCG** (synuclein, gamma) jelezhetik előre.

A recidíva-mentes túlélést taxol és carboplatin kemoterápiás kezeléssel átesett betegeknél a **MYRIP** (myosin VIIA and Rab interacting protein) és a **SNCG** (synuclein, gamma) segítségével jelezhetjük előre.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

A petefészekrák molekuláris genetikai vizsgálata új megvilágításba helyezi a betegség kialakulását. Az irodalomban fellelhető korábbi vizsgálatok korlátait átlépve a Gene Expression Omnibus által elérhető nyilvános adatok segítségével valódi meta-analízist végeztem. Összegyűjtöttem az összes fellelhető korábbi publikációt, mely a petefészek karcinogenezisével, szövettani típusaival és prognózisának előrejelzésével foglalkozott. A meta-analízis alapján azonosított új géneket RT-PCR vizsgálattal validáltam 64 petefészek daganatban szenvedő páciens mintáin

### 5.1. Multigénés markerek klinikai alkalmazhatósága

Munkám során először megvizsgáltam az irodalomban fellelhető összes génexpressziós vizsgálatot, amely a petefészekrákkal kapcsolatban állhat. A különböző vizsgálatok különböző microarray technikákkal készültek. Ezek alapján összesen 463 gént találtam, melyek összefüggésbe hozhatók a petefészekrák szövettani típusaival. Ugyanakkor egyetlen olyan gént sem találtam köztük, melyet azonosítottak volna legalább két különböző vizsgálatban.

Vizsgálattal nem sikerült alátámasztanom több tanulmány klinikai jelentőségét. A korábban megjelent génlistából mindössze 8 esetben sikerült szignifikáns összefüggést találni a kórkép viselkedésével kapcsolatban, és egyik génlista sem bizonyult szignifikánsnak a kezelést követő túlélés előrejelzésére. A legvalószínűbb magyarázata annak, hogy a vizsgálatokat nem tudtam reprodukálni, az lehet, hogy korábban csak alacsony esetszámokat használtak fel. Szerepet játszhat még az is, hogy nem azonos klinikó-patológiai paramétereket hasonlítottak össze, a nyers klinikai adatok feldolgozására különféle módszereket használtak, valamint egyes tanulmányok in vitro vizsgálatok során nyert adatokkal dolgoztak. A vizsgálatokhoz felhasznált microarray platformok is rendkívül különbözőek voltak.

### 5.2. A szövettani osztályozás monogénés markerei

Sikerült azonosítani és validálni a petefészekrák különféle szövettani típusait meghatározó géneket, és ezzel sikerült alátámasztani azt a korábbi elméletet, hogy a daganat génexpressziós mintázata alkalmas a szövettani típus megállapítására. A magas malignitással rendelkező serous ovárium carcinomát klinikai mintákon is egyértelműen azonosítani lehet a következő génekkel: **GAS1** (growth arrest-specific 1 fehérje), **WT1** (Wilms tumor 1), **MSLN** (mesothelin), **NPR1** (natriuretic peptide receptor A/guanylatecyclase A), **TSPAN8** (tetraspanin 8), **ARHGAP29** (Rho GTPase activating protein 29), **MUC16** (mucin 16, cell surface associated), **ZYX** (ESP-2, HED-2), **MYO9B** (myosin IXB), **SNCG** (synuclein, gamma/breast cancer-specific protein 1), **TUBB1** (tubulin, beta 1), **MAP4** (microtubule-associated protein 4), **TUBA1B** (tubulin, alpha 1b).

Vizsgálataim alapján a **TOP2A** gén (topoisomerase (DNS) II alpha) képes elkülöníteni a magas malignitású serosus tumort az alacsony malignitású borderline daganattól. A gén a sejtciklus szabályozásában, illetve a sejt proliferációban játszik szerepet. Egyes tanulmányok a **TOP2A** expressziójának fokozódását mutatták ki malignus petefészek daganat esetében, illetve feltételezik szerepét a kemorezisztencia kialakulásában is. Platina alapú kemoterápiás kezelést követően, amennyiben a daganat recidivál, a gén csökkent expresszióját lehet kimutatni a recidív tumorban, illetve a recidív daganat kemoterápiára rezisztenssé válik, amennyiben a **TOP2A** gén expressziója csökkent. A fenti tanulmányok egyike sem vizsgálta, hogy van-e különbség a génextpresszió mértékében a borderline és malignus daganatok között. Ezt elsőnek nekem sikerült leírni.

### 5.3. A túlélés előrejelzése

Beteganyagomban három gént sikerült azonosítani (**ESR2** ösztrogén receptor 2 (ER beta), **PGR** progeszteron receptor és **TSPAN8** tetraspanin 8) mely alkalmas a kezelést követő teljes túlélés előrejelzésére, valamint két gént sikerült kimutatni (**MAPT** microtubule-associated protein tau és **SNCG** synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)) amik a recidíva-mentes túlélést jelezhetik előre.

Az **ESR2** (ösztrogén receptor 2) a sejt proliferációban és az apoptózis szabályozásában játszik szerepet. Lurie és munkatársai bebizonyították, hogy bizonyos génpolimorfizmus esetén a petefészekrák kialakulásának esélye megnő.

Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy alacsony malignus potenciállal rendelkező, valamint low-grade petefészek rákok esetében az ösztrogén receptor nagyobb arányban fordul elő. Ez azt sugallja, hogy ezen daganatok esetében a kezelésében nagyobb szerepet kaphat a hormonális kezelés. Tanulmányomban a microarray adatok azt mutatták, hogy az ösztrogén receptort kódoló gén (**ESR2**) expressziójában kimutatható különbség volt az alacsony és magas malignus potenciállal rendelkező daganatok esetében. Amennyiben a daganat ösztrogén receptor (**ESR2**) és/vagy progeszteron receptor (**PGR**) pozitív, a várható túlélés is magasabb. Hasonló összefüggést sikerült kimutatnia Sinn munkacsoportjának is. Cikküket azonban már a mi közleményünk után, 2011 novemberében publikálták.

Az, hogy a túléléssel kapcsolatos gének között két hormonreceptor is van (az ösztrogén és progeszteron receptora), arra utalhat, hogy a petefészekrák kezelésében nagyobb hangsúlyt kell fordítani a receptor státusz vizsgálatára, és az esetleges hormonkezelésre. 2012 januárjában jelent meg Lee és munkatársai tanulmánya, melyben sejtvonalakon tesztelték az antiösztrogén tamoxifen és progeszteron adásának hatását. Mindkét szer önmagában is növelte a sejtciklus G1 fázisában szabályozó szerepet játszó p21, p27, p16 és phospho-pRb szintjét, melyek a sejtosztódás leállításában játszanak szerepet.

Tanulmányomban még a tetraspanin 8 (**TSPAN8**) szerepét sikertült igazolnom a túlélés előrejelzésében. A gén egy fehérjét kódol, mely a transzmembrán szuperclad 4 része. Ennek megfelelően egy olyan transzmembrán fehérje, mely jelátviteli folyamatokban játszik közvetítő szerepet a sejtfelszín két oldala között. Szerepet játszik a sejt fejlődésében, aktivitásában, növekedésében és motilitásában. Ugyancsak képes komplexet alkotni a sejtfelszíni integrinokkal, melyek a sejt extracelluláris mátrixhoz kötődésében játszanak szerepet. A tetraspanin 8 szerepét petefészek daganatokban még senki sem vizsgálta.

A recidíva-mentes túlélést vizsgálatomban a **MAPT** (microtubule-associated protein tau) és az **SNCG** (synuclein gamma) volt képes előre jelezni.

A **MAPT** a microtubulusok stabilizálásában játszik kulcsszerepet. A tubulinok alfa és béta alegysége dimereket alkot, majd ezek a dimerek kapcsolódnak össze mikrotubulusokká, melyek a sejtek belső vázát alkotják. Ezt a folyamatot irányítja a MAPT gén. A gén szerepét petefészek daganatokban még senki sem vizsgálta.

A gamma synuclein **SNCG** (breast cancer-specific protein 1) szerepe a normális sejtműködésben nagyrészt még jelenleg is ismeretlen. A génnek fontos szerepe van az emlőrák progressziójában is, innen is származik második neve (breast cancer-specific protein 1). Jiang és munkatársai kimutatták, hogy a gén működése erősen stimulálja a ligand függő transzkripció aktivitását az ösztrogén receptor 1-nek emlőrákból származó sejtekben. Az SNCG aktivitás növelése egyértelműen fokozta az ösztrogén receptorok képződését és a sejtnövekedést. Szintjének csökkentése az ösztrogénfüggő sejtosztódás gátlását váltotta ki. A synuclein által kiváltott sejtosztódást antiösztrogének hatékonyan gátolták. Gupta és munkatársai a gén metilációját vizsgálták emlő és petefészekrák sejtvonalakon (normális emlő és petefészek epitheliális sejtekben a gén inaktív állapotban van). A gén metilációs mintázata szövetspecifikusnak bizonyult, vagyis más régiókban volt kimutatható az emlő, mint a petefészek sejtekben. Mindkét daganatféléseggben a sejtosztódás gátlása az SNCG hypermetilációjához vezetett, ezzel a gén expressziója gátolva volt. A gén hypometilációja a génavaktivitás fokozódásához, illetve a sejtosztódás felgyorsulásához vezetett.

Értekezésemből egyértelműen látszik, hogy a petefészekrák genetikai vizsgálata még korántsem letisztult tudomány. Jelenleg a betegség kialakulásában és viselkedésében szerepet játszó gének meghatározásánál tartunk. Ebben képvisel előrelépést dolgozatom. Új jövőbeli módszerek, mint például az RNS-szekvenálás, várhatóan lehetővé fogják tenni, hogy különböző adatokat, mint genotípus, génexpresszió és fenotípus egymással összekössünk, és ezáltal egy olyan komplex meta-analízis lehetőségét teremtsük meg, amely a biológiai folyamatok különböző szintjeit is összekapcsolják egymással.

## SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Összesített impact faktor: **19,587**.

Ezekből az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények impact faktora: **6,858**.

### Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Fekete T**, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy G, Sipos N, Rigó J jr, Györfly B. Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *Int J Cancer*. 2011 Aug 19. doi: 10.1002/ijc.26364. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21858809. **IF: 4,926**
2. Györfly B, Dietel M, **Fekete T**, Lage H. A snapshot of microarray-generated gene expression signatures associated with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:1215-1233. **IF: 1,932**

### Független közlemények

1. Szél Á, Lukáts Á, **Fekete T**, Petry HM, Somogyi J, Cooper HM, Röhlich P. Visual pigment coexpression in cone cells. *Med. Sci. Mon* 1998. 4, 45-46. **IF: 0**
2. Szél Á, Lukáts Á, **Fekete T**, Szepessy Zs, Röhlich P. Photoreceptor distribution in the retinas of subprimate mammals. *J Opt Soc Am A*. 2000. 17, 568-579 **IF: 1,481**
3. Szepessy Zs, Lukáts Á, **Fekete T**, Barsi Á, Röhlich P, Szél Á. Cone differentiation with no photopigment coexpression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000. 41, 3171-3175 **IF: 4,373**
4. Szabó I, Csabay L, Belics Z, **Fekete T**, Papp Z. A méh vérkeringésének transvaginalis színes Doppler-ultrahangvizsgálata méhen kívüli terhességben. *Magy. Nőorv. L.* 2002. 65, 259-265. **IF: 0**
5. **Fekete T**, Tóth Z, Szabó I, Csabay L, Papp Z. Quality control in prenatal ultrasonography in Hungary. XVIIIth International Congress of the Society of The Fetus as a Patient. Budapest, 2002. április 25-28. *Fetal Diagn. Ther.* 17 Suppl. 1 2002. 97-98. **IF: 1.142**
6. Belics Z, Csabay L, Beke A, Szabó I, **Fekete T**, Papp Z. Az ossa ilii által bezárt szög mérésével szerzett tapasztalataink a 18-as trisomia ultrahangszűrésében. *Magy. Nőorv. L.* 2003. 66, 163-166. **IF: 0**
7. **Fekete T**. Ultrasound imaging of early extraembryonic structures. *Ultrasound Rev. Obstet. Gynecol.* 2003. 3, 240-243. **IF: 0**



8. Papp Z, **Fekete T**. The evolving role of ultrasound in obstetrics/gynecology practice. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2003. 82, 339-346. **IF: 0,800**
9. Szabó I, Csabay L, Belics Z, **Fekete T**, Papp Z. Assessment of uterine circulation in ectopic pregnancy by transvaginal color Doppler. *Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.* 2003. 106, 203-208. **IF: 1,002**
10. Gávai M, Papp Z, Inovay J, **Fekete T**: Myomectomy as an alternative to hysterectomy in cases with uterine fibroids. *J. Perinat. Med.* 31 Suppl. 1 2003. 149 - 150. **IF: 0,866**
11. Beke A, Joó JG, Csaba Á, Papp Cs, Tóth-Pál E, Bán Z, Belics Z, **Fekete T**, Barakonyi E, Papp Z. Ultrasound minor and major anomalies detected in fetuses with aneuploidies in second trimester. In: *Perinatal Medicine*. Ed. Antsaklis, Medimond International, Bologna, 2004. pp. 109-113. IF: 0
12. Belics Z, Csabay L, Szabó I, Beke A, **Fekete T**, Halmos A, Papp Z. Prenatal sonographic measurement of the fetal iliac angle during the second trimester of the pregnancy. *Medimond Monduzzi Editore, Bologna*, 2004. pp. 115-118. IF: 0
13. Belics Z, Csabay L, Szabó I, Beke A, **Fekete T**, Halmos A, Jenei K, Papp Z. Association between the sonographic measurement of the fetal iliac angle and most common fetal aneuploidies. In: *Perinatal Medicine*. Ed. A. Kurjak and F.A. Chervenak, Medimond Publisher, Bologna, 2005. pp. 241-245. IF: 0
14. **Fekete T**. A Müller-cső rendellenességeinek ultrahangvizsgálata. *Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle.* 2005. 7, 351-353. IF: 0
15. **Fekete T**, Belics Z, Halmos A, Jenei K, Hargitai B, Csabay L, Szabó I, Papp Z. Exomphalos complicated with umbilical cord teratoma. In: *Perinatal Medicine*. Ed. A. Kurjak and F.A. Chervenak, Medimond Publisher, Bologna, 2005. pp. 401-403. IF: 0
16. Halmos A, **Fekete T**, Csabay L, Belics Z, Szabó I, Csapó Zs. Chorionangiómával szövődött terhességek klinikánk 15 éves anyagában. *Magy. Nőorv. L.* 2006. 69, 115-119. IF: 0
17. Gavai M, Berkes E, Lazar L, **Fekete T**, Takacs ZF, Urbancsek J, Papp Z. Factors affecting reproductive outcome following abdominal myomectomy. (Journal Article) *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2007. 24(11): p525-31. **IF:0,913**
18. Somos P, Rab A, **Fekete T**, Belics Z, Szabó I. A hysterosalpingographia és a 2D/3D ultrahangvizsgálat értéke a méh kettőződési rendellenességeinek diagnosztikájában (Journal Article) *Magyar Nőorvosok Lapja*, 2007. 70: p295-303. IF: 0
19. Gavai M, Berkes E, **Fekete T**, Lazar L, Takacs ZF, Papp Z. Analysis of perioperative morbidity according to whether the uterine cavity is opened or

remains closed during abdominal myomectomy--results of 423 abdominal myomectomy cases. Clin Exp Obstet Gynecol. 2008;35(2):107-12. IF: 0

20. Belics Z, **Fekete T**, Beke A, Szabó I. Prenatal ultrasonographic measurement of the fetal iliac angle during the first and second trimester of pregnancy Prenat Diagn 2011; 31: 351-355. **IF: 2,152**

### Könyvfejezetek

1. Papp Z, **Fekete T**. A szülészeti-nőgyógyászati ultrahangvizsgálatok etikai és jogi vonatkozásai. In: Szülészeti-nőgyógyászati ultrahang-diagnosztika. Szerk. Tóth Z, Papp Z. White Golden Book Kiadó, Budapest, 2001. pp. 441-448.
2. **Fekete T**. A méhlepény és a köldökzsinór rendellenességei. A várandós nő gondozása. Szerk. Rigó J. Jr., Papp Z. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest 2005. pp. 197-200.
3. **Fekete T**, Papp Z. Ultrasound imaging of early extraembryonic structures. In: Kurjak A, Arenas JB. ed. Donald School Textbook of Transvaginal Sonography. 2005. pp. 55-62.
4. Belics Z, **Fekete T**, Szabó I, Papp Z. Urethral obstruction sequence. In: Donald School Atlas of Fetal Anomalies. Ed. A. Kurjak, FA. Chervenak, J.M. Carrera. Jaypee Brothers, New-Delhi, 2006. pp. 293-295.
5. **Fekete T**, Belics Z, Papp Z. Extraembryonic structures in early pregnancy. In: Donald School Atlas of Fetal Anomalies. Ed. A. Kurjak, FA. Chervenak, J.M. Carrera. Jaypee Brothers, New-Delhi, 2006. pp. 296-304.
6. Papp Z, **Fekete T**. Szülészeti-nőgyógyászati ultrahangvizsgálatok etikai és jogi vonatkozása. In: Szülészeti-nőgyógyászati ultrahang-diagnosztika. Szerk. Tóth Z., Papp Z. White Golden Book Kiadó, Budapest. 2006. pp. 545-554.
7. **Fekete T**, Belics Z, Papp Z. Hígado fetal y árbol biliar. In: José M Carrera, Asim Kurjak (szerk.) Ecografía en diagnóstico prenatal. Amsterdam: Elsevier, 2008. pp. 319-323.
8. Belics Z, **Fekete T**, Papp Z. Anomalías gastrointestinales. In: José M Carrera, Asim Kurjak (szerk.) Ecografía en diagnóstico prenatal. Amsterdam: Elsevier, 2008. pp. 299-318.