

Az emberi májrák komparatív genomikai osztályozása

Doktori tézisek

Dr. Kaposi-Novák Pál

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss András, egyetemi docens, Ph.D., az orvostudományok kandidátusa

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Gábor, Ph.D.
Dr. Mózes Miklós, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Sótónyi Péter, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lengyel Gabriella, Ph.D.
Dr. Simon Károly, Ph.D.

Budapest
2008

1. Bevezetés

A hepatocelluláris carcinoma, avagy májrák, előfordulását tekintve az ötödik leggyakoribb rosszindulatú daganatos betegség a világon, és évente több mint 500,000 ember halálát okozza. A májrák kialakulásához vezető legfontosabb rizikófaktorok viszonylag jól ismertek. A daganat kialakulását szinte minden esetben több évtizedes krónikus májgyulladás előzi meg, amelynek hátterében legtöbbször krónikus hepatitis B, hepatitis C fertőzés, toxikus vagy metabolikus eredetű elváltozások állnak, amelyek gyakran májcirrhózissal is társulnak. Jól ismert, hogy a malignus tumorok kialakulásának hátterében a sejtproliferációt és a sejthalált szabályozó géneket érintő genetikai elváltozások szekvenciális felhalmozódása áll. Az egymásra halmozódó genetikai és epigenetikai elváltozások lépésről lépésre történő felhalmozódása vezet először a tumorok kialakulásához, és azok disszeminációjához. Bár a májrákokban számos jelentős szereppel bíró genetikai elváltozást sikerült azonosítani, a hepatokarcinogenezis pontos patomechanizmusa egyelőre nem ismert. A Rb, E-cadherin, p16 és egyéb tumor szupresszor gének allélvesztés és epigenetikai eltérés révén történő inaktivációja már korai neoplasztikus elváltozásokban is kimutatható. Az előrehaladott stádiumban lévő májtumorok pedig, számtalan a genom egészét érintő genetikai eltérést tartalmaznak, amelyek között a p53 és β -catenin onkogének mutációja, valamint a 1q és 8q kromoszóma régiók amplifikációja és a 8p és 17 q szakaszok deléciója fordul elő a leggyakrabban. A HCC betegek igen magas halálozási arányát elsősorban a daganat terápiás próbálkozásokkal szembeni rezisztenciája okozza. A HCC betegeknek csak a legkorábbi stádiumban diagnosztizált viszonylag kis hányada bizonyul alkalmasnak valamely agresszív sebészi kezelésre, mint a májtranszplantáció vagy a májrezekció, ami kuratív lehet. Mai tudásunk szerint a májcarcinoma sejtek rezisztensek szinte az összes elérhető kemoterápiás szerrel szemben, ezért az előrehaladott stádiumban lévő betegek számára a terápiás lehetőségek száma limitált. A tumor ellenes szerek új generációja áll kifejlesztés alatt. Ezek a tumor kialakulásában szerepet játszó jelátviteli utakat specifikusan gátolva fejtik ki terápiás hatásukat. Számos ilyen szer, mint a bevacizumab vagy sorafenib, biztató eredményeket mutattak a kezdeti klinikai tesztek során. Ezért nélkülözhetetlen, olyan molekuláris klasszifikációs módszerek kifejlesztése, amely képes a változatos genetikai elváltozásokat tartalmazó májcarcinómák között azokat beazonosítani, ahol ezeket az új, célzott terápiás szereket a legnagyobb sikerrel alkalmazhatjuk.

A nagy felbontású genetikai profilalkotási technikák elterjedésével a rendelkezésünkre álló genetikai információ drámai módon megnövekedett. Elérhetővé vált, a tumorsejtekben

végbemenő összes transzkripció elváltozás egyidejű detektálása. Az expressziós mikroarrayket sikeresen alkalmazták különféle humán tumorok molekuláris hátterének feltérképezésére. A májrákban is meghatározásra kerültek a különféle klinikai, prognosztikai és virális faktorokhoz köthető génexpressziós eltérések. A tumorokban látott expressziós profilok komplexitása miatt, azonban az elváltozás hátterében álló onkogenetikai elváltozás direkt azonosítása általában nem lehetséges. Az egyes jelátviteli útvonalak aktivációjára jellemző transzkripció mintázatokat szövetkultúrákban valamint állatmodellekben, ahol a kísérletes változók megfelelően kontrolálhatók, viszonylag egyszerűbben azonosíthatjuk. A komparatív genomikai módszerek pedig lehetővé teszik, hogy evolúció során konzervált orthológ gének egymás mellé rendezése révén, a kísérleti modellekből származó mintázatokat a humán léziókban is vizsgálhassuk. Így olyan új molekuláris klasszifikációs rendszereket hozhatunk létre, amelyekben az emberi tumorok pathogenetikai hátterük alapján kerülnek besorolásra.

A technológia fejlődésével elérhetővé vált, hogy a paraffinba ágyazott szöveti mintákban található RNS kinyerése, ami korábban nem volt általánosan lehetséges. Korábbi tanulmányok az mutatják, hogy alternatív szöveti fixatívumok, mint a például az RNAlater használata a hagyományos formalin fixációval szemben jelentősen javíthatja a patológiai mintákból molekuláris analízisre kinyerhető nukleinsavak mennyiségét és minőségét. Az új, jobb hatékonyságú RNS izolációs metódusok elterjedése további segítséget nyújthat a paraffinba ágyazott archivált szövetekben rejlő genetikai információ feltárásában. A szöveti RNS mennyiségét mérni képes valós idejű PCR elemzések során relatív rövid szekvenciák kerülnek felamplifikálásra, ezért ez a technika különösen alkalmas olyan minták elemzésére, ahol az RNS fragmentált. Ugyanakkor bármilyen fixáció esetén alapkövetelmény a szöveti morfológia, illetve az immunhisztokémiai markerek reaktivitásának mind tökéletesebb megőrzése. Ezek ugyanis nélkülözhetetlenek a pontos patológiai diagnózis felállításához. Ezáltal a patológiai archívumokban tárolt szövetekben rejlő genetikai információ elérhetővé válik a kutatás számára, ami jelentős számú, kiválóan dokumentált minta elemzését teszi lehetővé. A rutin módon kezelt szövettani mintákon végzett expressziós vizsgálatok ezen felül lehetőséget teremtenek új molekuláris tesztek diagnosztikai bevezetésére is.

A komplex illetve kisméretű elváltozások elemzése során gyakran felmerülő probléma, hogy az eltérő szöveti alkotóelemek, a morfológiailag jelentősen különböző sejtesoportokban bekövetkező transzkripció elváltozások csak egymást átfedve, esetenként zavarva értékelhetők. A mikroarray alapú gén expresszió analízis a lézer mikrodisszekció és a mágnesgyöngyös vagy áramlási citometriás sejtszétválasztási technikák kombinációjával lehetővé vált, hogy az egyes komplex elváltozásokon belül csak egy meghatározott

sejtpopulációt vizsgáljunk. Például egy tumoron belül külön elemezhetjük az epitheliális és a kötőszöveti komponenst. A kinyert minta mennyisége azonban sok esetben nem teszi lehetővé a hagyományos cDNS jelölési módszerek alkalmazását, amelyekhez legalább 100 ng poly(A) szeparált mRNS vagy 10-20 µg totál RNS szükséges. Ilyenkor az RNS minta amplifikációjára van szükség, amire számos PCR alapú és lineáris amplifikációs technika került leírásra. Mára az oligonukleotid próbákat tartalmazó mikroarrayk váltak a legelterjedtebb platformmá. Ezeknél a mintákat általában, indirekt, aminoallyl konverzióval alapuló reakcióval jelöljük. Annak érdekében, hogy az új platformokon kis mennyiségű klinikai mintákat is elemezhessünk, a hagyományos lineáris RNS amplifikációs módszereket módosítására elkerülhetlenné vált.

Kísérleteink során a legfejlettebb molekuláris biológiai módszereket használtuk fel annak érdekében, hogy a humán hepatokarcinogenezis folyamatát jobban megismerhessük, és olyan molekuláris klasszifikációs rendszereket dolgozzunk ki, amelyek lehetővé teszik a májrákban szenvedő betegek prognózisának megbecslését, és teret nyitnak a személyre szabott molekuláris terápiák előtt.

2. Célkitűzés

2.1 Rutin szöveti fixációs metodikák hatása a patológiai minták expressziós analízisére. Vizsgáltuk, hogy a különböző rutin szövettani fixációs metodikák (formalin, aceton, etanol) milyen mértékben őrzik meg a szövetekben az mRNS integritását, valamint azt, hogy real-time RT-PCR segítségével lehetséges-e az ily módon archivált tumor minták transzkripció analízise.

2.2 A kis mennyiségű biológiai minták oligonukleotid mikroarray alapú expressziós analízisét lehetővé tevő lineáris RNS sokszorozási technológia kifejlesztése. Célul tűztük ki olyan mRNS amplifikációs metodika kifejlesztését, amely kétkörös virális RNS polimeráz (T7 és T3) amplifikációt alkalmazva sense szekvenciájú RNS terméket generál, és felhasználható aminoallyl jelölt cDNS szintézisére.

2.3 A T7T3 lineáris RNS sokszorosítás reprodukálhatóságának és megbízhatóságának vizsgálata. Bizonyítani kívántuk, hogy a T7T3 metodika lehetővé teszi igen kis mennyiségű, lézer mikrodisszektált szöveti minták mikroarray analízisét oly módon, hogy az amplifikáció eredménye reprodukálható és jól korrelál az amplifikáció nélküli mikroarray kísérletekben kapott génexpressziós értékekkel. Ezáltal jól alkalmazható kisméretű hepatikus léziók vizsgálatára.

2.4 A HGF/c-Met jelátviteli útvonal által transzkripció szinten regulált célgének azonosítása genetikailag módosított egérmodell segítségével. Célunk volt, hogy *c-met* kondicionális knock-out és kontroll egerekből izolált primer hepatociták génexpresszióját rekombináns HGF kezelés után különböző időpontokban (30 perc, 2, 12 és 24 óra) mikroarrayvel vizsgálva feltérképezzük, és meghatározzuk a HGF/c-met jelátviteli útvonal aktivációja által indukált hepatocita specifikus transzkripció választ.

2.5 HGF májsejtekben betöltött fiziológiás hatásának elemzése a célgének funkcionális klasszifikációjával. Vizsgálni kívántuk, a HGF célgének funkcionális klasszifikációja alapján, a HGF/c-Met útvonal aktivációjának hatását a májsejtek fenotípusára és homeosztázisára.

2.6 Humán hepatocelluláris carcinoma molekuláris klasszifikációja összehasonlító funkcionális genomikai módszerekkel. A komparatív funkcionális genomikai elemzést alkalmazva az elsők között vizsgáltuk a genetikailag módosított egérmodellben beazonosított HGF/c-Met specifikus célgének expressziós profilját humán hepatocelluláris, karcinómákban és azonosítottuk a humán tumorok azon alcsoportját, ahol a c-Met aktiváció részvétele a tumor patogenezisében kimutatható.

2.7 A c-Met útvonal aktivációjának a humán májrák patogenezisében betöltött szerepének vizsgálata. Az expressziós mintázat alapján a HGF/c-Met útvonal aktivációját mutató májrákoknak a többi tumorra való összehasonlító klinikopatológiai elemzése során feltártuk azon változók csoportját, amelyek összefüggést mutatnak a génexpressziós mintázattal.

2.8 Génexpressziós mintázaton alapuló prediktív statisztikai modell megalkotása. Célunk volt, hogy a c-Met indukált génexpressziós mintázat és túlélés korrelációja alapján, olyan predikciós modellt alkossunk, ami képes a HCC betegek prognózisának előrevetítésére.

3. Módszerek

3.1 A humán máj és endometriális minták gyűjtése.

Az endometrium minták jóindulatú méhelváltozásban szenvedő, menopausa előtt lévő 35-43 év közötti betegekből származtak, akik a beavatkozást megelőzően semmilyen hormonkezelést nem kaptak. A tizennyolc humán endometrium minta mindegyikét a hisztorektómiát követően azonnal háromfelé osztottuk, és fixáltuk a három különböző fixatív valamelyikében. A szövetdarabokat 5-5 ml friss 10% puffereelt (pH 7.0) formalinban vagy RNAlaterben egy napig, vagy 5 ml CuSO₄ szaturált acetoneban hatvan percig szobahőn fixáltuk. Ezt követően a mintákat a rutin szövettani protokollt követve paraffinba ágyasztuk.

A 139 hepatocelluláris carcinoma mintát és 60 párosított tumormentes környező májból vett mintát, 138 lobektómián átesett májrákos betegből izoláltuk. A tumorok között virális (HBV, HCV), toxikus és örökletes anyagcserezavar (hemokromatózis, α 1-antitripszin hiány) hátterén kialakuló is megtalálhatóak voltak. Hetven beteg estében tumor közeli májból származó nem tumor minta is elérhető volt. Normál kontrollként tizennyolc, metasztatikus vastagbélrák vagy közlekedési baleset miatt májrezekción átesett betegekből származó tumormentes mintákat használtunk. A szövetek tárolása és felhasználása az összes érintett intézet kísérleti bizottsága által jóváhagyottan történt.

3.2 Egér modellek.

A c-Met receptor kondicionális knock-out egérmódel létrehozása során a c-Met gén 16-os exonja került módosításra a Cre-loxP metodika felhasználásával. A c-Met 16-os exonját megcélzó gén konstrukttal a 16-os exon megelőző intronba egy loxP felismerőhelyet, míg az exont követő intronba egy flox szakasz határolt neomicin rezisztencia gén szakaszt juttatunk. Az így létrehozott c-Met^{wt/t} állatoknak keresztezése során homozigóta c-Met^{flox/flox} és c-Met ^{Δ 16/ Δ 16} genotípusok jöttek létre. Az Alb-Cre törzsben a Cre rekombinááz expresszióját a humán albumin gén promótere szabályozza, így a Cre indukált deléció a posztnatális májsejtekre specifikus. A c-Met^{flox/flox} és Alb-Cre vonalak párosításával létrejöttek az Alb-Cre^{+/-} / c-Met^{flox/flox} kondicionális KO és a kontrollként használt Alb-Cre^{+/-} / c-Met^{wt/wt} genotípusok.

Az RNS amplifikációs kísérletek során használt Alb c-myc montranszgen és az Alb c-myc/ MT TGF- α kettős transzgen egér törzsek létrehozásának részletes leírása, valamint az ezekre, az állatokra jellemző patológiai elváltozások összefoglalása szoroson nem kapcsolódik a dolgozat témájához, de korábbi közleményekben elérhető. A májcarcinoma mintákat nyolc hónapos állatokból gyűjtöttük. A negatív kontroll minták két B6/CBA genotípusú egér

májból kerültek felhasználásra. Minden állatkísérleti eljárás a National Institutes of Health állatkísérletekre vonatkozó irányelvei szerint került végrehajtásra.

3.3 Primer májsejtek izolálása és kezelése

A primer májsejtek izolálásához két lépcsős kollagenáz emésztést használtunk. A kollagenáz emésztést követően, az életképes májsejteket (~95%) az egyéb sejt frakcióktól percoll sűrűség gradiensen-centrifugálással választottuk el. Az így megtisztított májsejt frakcióból edényenként 2×10^6 sejtet a letapadást segítő médiumban 10 cm átmérőjű kollagénal bevont sejt kultúra edényekbe osztottuk szét. Négy órás inkubáció után a letapadt sejteken a kezdeti médiumot szérum mentes médiumra cseréltük. A sejteket egy éjszakán át szérum mentes környezetben növesztettük, majd 50 ng/ml rekombináns humán HGF-fel kezeltük a fél, két, tizenkettő illetve huszonnégy órán át. A nem kezelt vad-típusú és c-Met/- sejteket pedig 0 órás kontrollként alkalmaztuk. Minden kísérletet triplikátumban ismételtünk meg. A hibridizációs referenciaként pedig több B6/129 vad genotípusú egerből frissen izolált és összekevert primer májsejteket használtunk

3.4 Lézer mikrodisszekció

A vad típusú és a transzgenikus egerek májából származó szövetminták OCT médiumban kerültek beágyazásra és lefagyasztásra. A fagyasztott blokkokból 7 μ m vastagságú metszeteket vágunk, amelyeket kezeletlen üveg tárgylemezekre vittünk fel és a mikrodisszekcióig -80 °C-on tároltuk. A metszeteket alcian kék festékkel festettük 10 másodpercig, majd felszálló alkohol soron (50%, 75%, 95% és 100%. mindegyikben 20 másodperc) dehidráltuk. A mikrodisszekcióhoz az Arcturus PixCell Iie lézer mikrodisszekciós készüléket használtuk. Mind a tumorsejtek, mind a normál minták mikrodisszekciója során ezer darab, 30 μ m átmérőjű impulzusnak megfelelő nagyságú területet vágunk ki. Mintánként mintegy 3000-4000 sejtet gyűjtöttünk guanidiumot tartalmazó RNS lízis oldatba.

3.5 RNS izoláció

A paraffinba ágyazott endometrium mintákból öt 10 μ m vastagságú metszetet vágunk, majd ezekből a deparaffinizációt követően teljes a High Pure RNA Paraffin kit felhasználásával teljes RNS-t izoláltunk. A primer májsejtekből az RNS-t Trizol reagenst segítségével a humán mintákból a teljes RNS-t CsCl gradiens centrifugálással nyertük ki. A mikrodisszekciót szövetmintákból történő RNS izoláláshoz PicoPure kisset használtunk. A dnáz emésztést az izoláló oszlopon hajtottuk végre. Az RNS koncentrációját NanoDrop ND

1000 spektrofotométerrel mértük meg. Az RNS minták integritását a Bioanalyzer kapilláris elektroforézis készülékkel ellenőriztük a gyártó útmutatásai alapján.

3.6 Kvantitatív real-time PCR elemzése

Az izolátumokból 0.5 µg teljes RNS-t (10 µl térfogatban) *Mmulv* reverz transzkriptáz (Applied Biosystems N8080127) enzimrel cDNS-re írtunk át. Az átírás során a mintákat tíz percig 42 °C-on, ötven percig 42 °C-on és öt percig 95 °C-on inkubáltuk. A GAPDH és β-globin gének átíródásának kvantitatív elemzése során, a PCR reakciókhoz 2 µl cDNS templátot használtunk. A 25 µl térfogatú reakcióelegy a 12.5 µl 2-szeres SYBR Green (Biorad 1708882) puffer hozzáadása után a két primert 300 nmol/l koncentrációban tartalmazta. Két perc 95 °C-on történt denaturáció után, minden mintával 40 PCR ciklust (60 másodperc 95 °C-on, 60 másodperc 60 °C-on, 120 másodperc 72 °C-on futtatunk le a Biorad iCycler Real-time PCR berendezésen. Az olvadáspont analízis során a mintákat 55 °C-ról 95 °C-ra hevítettük és a termékeket a jellegzetes disszociációs csúcs alapján azonosítottuk. A relatív kvantifikáció során a legkisebb amplikon hosszúságú GAPDH termék amplifikációját használtuk referenciaként. Az PCR reakciókat triplikátumban megismételtük és az egyes termékekre jellemző C_T értékeket az ismételt mérések átlagából számítottuk ki. A különböző módon fixált minták közötti relatív expressziós értékeket a Pfaffl és társai által kidolgozott Pairwise Fixed Reallocation Randomisation teszt alapján állapítottuk meg.

3.7 Mikroarray platformok

A Compugen által gyártott egér oligonukleotid könyvtár 21997, 65 bp hosszúságú próbát tartalmaz, amelyek 19140 egyedi gént és expresszált szekvenciát reprezentálnak. Az Operon V2 humán hosszú oligonukleotid próba szett 21329 egyedi, 70 bp hosszúságú próbát tartalmazott. Az oligonukleotid próbák 384 zsebes mikrotiter lemezen 3 x SSC pufferben, 20-30 µM koncentrációban lettek feloldva. A próbák 160 µ denzitással kerültek az amino-szilán bevont üveg tárgylemezeken nyomtatásra. A mikroarrayket az NCI Advanced Technology Center-ben nyomtatták.

3.8 A minták jelölése és a mikroarrayk hibridizációja

A primer egér májsejtekből, illetve a humán szövetekből izolált teljes RNS mintákat fluoreszcens jelölésére indirekt aminoallyl metodikát alkalmaztunk. A cDNS mintákat a hozzáadott Cy3 és Cy5 fluoreszcens festékekkel jelöltük. A mikroarrayk hibridizációja során az összes humán, illetve egér mintát egy-egy közös referencia mintával szemben hibridizáltunk. Minden egyes minta analíziséhez két arrayt használtunk fel, amelyek között a

kísérleti és a referencia minták fluoreszcens jelölését megcseréltük. A hibridizált után a próbák fluoreszcens jelét a GenePix 4000A fluoreszcens szkennelvel detektáltuk.

3.9 Statisztikai elemzés

A nyers mikroarray adatok filtrációját és normalizációját a NCI MadB webszerveren végeztük el. A humán carcinoma minták nem ellenőrzött klasszifikációja Michel Eisen Cluster és TreeView programjának felhasználásával történt. Az expressziós differenciát mutató gének kiválasztáshoz két karú t-tesztet használtunk, ahol a fals pozitív gének arányát az azonosítók random permutációja során határoztuk meg. A transzkripciós mintázaton alapuló predikciós modell megalkotásához a BRB Array Tools statisztikai csomagban elérhető hat algoritmust használtuk. A túlélési statisztikát az R programmal kalkuláltuk (<http://www.R-project.org/>).

4. Eredmények

4.1 A szöveti RNS integritása a különféle fixálószerekkel kezelt és paraffinba ágyazott humán endometrium mintákban.

Paraffinba ágyazott endometrium mintákon, kvantitatív PCR esszé segítségével vizsgáltuk az RNS integritását formalin, aceton, illetve RNAlater fixálást követően. A változó hosszúságú GAPDH és β -globin PCR termékek amplifikációs hatékonysága nem mutatott különbséget az egyes fixálószerek között. A 225 bp-nál rövidebb termékek minden minta esetében jól amplifikálhatóak voltak. Ennél hosszabb ampliconok esetén azonban a PCR reakciók hatékonysága jelentősen csökkent. A sejtmag és a citoplazma strukturális részleteit legjobban a formalin őrizte meg. A claudin 4 és claudin 7 immunfestés ugyancsak a formalinnal volt a legmegbízhatóbb. Az RNA-laterrel kezelt mintákban mind a festés intenzitása, mind az eloszlása egyenetlen volt.

4.2 Sense szálú termék szintetizálása a T7T3 lineáris RNS amplifikációs technológia segítségével.

Kifejlesztettünk egy új lineáris RNS amplifikációs protokollt, amely sense szálú aRNS terméket eredményez. Az első és második körben oligo(d)T₂₀-T7 és (N9)-T3 amplifikációs lépéseket kombinálva, a kiindulási mRNS-t átlagosan 2×10^4 -szeresére sokszoroztuk fel. Az amplifikáció után az RNS szakaszok hosszúsága 150 és 1,350 bp között váltakozott. Az aRNS minták akár a mikrodisszekált, akár a fagyasztott mintákból származtak, a reverz transzkripció és az aminoallyl reakció során megfelelően jelölődtek, és a mikroarray hibridizáció során jól detektálhatóak voltak.

4.3 A lineáris RNS amplifikáció reprodukálhatóságának vizsgálata transzgenikus egér tumorokon.

A T3T7 génamplifikációs metodika reprodukálhatóságát Myc és Myc/TGF α transzgen egerekben kifejlődő májkarcinómák elemzésével validáltuk. A legalább kétszeres regulációt mutató gének expressziós értékei igen magas korrelációt (Pearson $r=0.9$) mutattak a megismételt amplifikációs reakciók között. Az amplifikált mintákat a nem amplifikált mintákhoz hasonlítva a szignifikáns gének száma majdnem azonos (1036 vs. 1035) volt. A hierarchikus klaszter elemzés alapján megerősítést nyert, hogy az amplifikált minták az eredetihez nagyon hasonló ($r=0.78$) profillal rendelkeznek és a genotípusra jellegzetes expressziós mintázatok az amplifikáció során megőrződtek.

4.4 A HGF/c-Met regulált expressziós mintázat azonosítása c-Met kondicionális knock-out primer májsejtekben.

Meghatároztuk a hepatocitákban expresszáló HGF/c-Met útvonal által az átíródás szintjén szabályozott gének csoportját. A c-Met kondicionálisan kiütött és vad-típusú primer egér májsejtekből különböző időtartamú rekombináns humán HGF kezelés (0, ½, 2, 12 és 24 óra) után nyert mikroarray adatok összehasonlító elemzése során, 690 c-Met aktivált expressziós profilt mutató gént azonosítottunk. A c-Met knock-out sejtekben végbemenő hosszú távú adaptációt pedig az a 67 gén reprezentálta, melyek transzkripciós szintje permanensen különbözött a kontroll és knock-out sejtek között.

4.5 A c-Met szabályozott gének funkcionális elemzése és szerepük a sejt proliferációban, motilitásban és oxidatív homeosztázisban.

A HGF szabályozott gének funkcionális genomikai klasszifikációját a Gene Ontology adatbázis és a jelátviteli útvonalak kapcsolati térképei alapján végeztük el. Ennek során megerősítettük, hogy a fél és két óránál észlelt azonnali válasz géneken (Egr1, Hmga1, MafF, JunB) túl, a sejtadhézióban, a sejtmotilitásban és a sejtíváz felépítésében részt vevő gének (Fn1, Neo1, Robo1, Cldn2, Arpc1b, Cap1, Nck2, Msn, stb.) alkotják a c-Met szabályozott expressziós mintázat funkcionálisan legmeghatározóbb csoportjait. Elsőként fedeztük fel, hogy a HGF kezelés elnyomta számos oxidatív stressz válaszgén, közöttük az Nrf2 transzkripciós faktor és annak célgénjeinek átíródását. Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy a HGF/c-Met útvonal jelentős szerepet tölt be a májsejtek homeosztázisának szabályozásában.

4.6 A c-Met indukált expressziós mintázatot mutató humán májrákok azonosítása komparatív funkcionális genomikai módszerekkel.

A komparatív genomika módszereinek felhasználásával vizsgáltuk a HGF szabályozott gének átíródását humán hepatocelluláris carcinoma mintákban. Megállapítottuk, hogy az emberi májrákok egy jól meghatározható csoportjában (67/242, 27%) a HGF/c-Met célgének transzkripciós mintázata megegyezett a HGF kezelt vad-típusú májsejtekében mutatottal. Ez pedig a c-Met útvonal aktivációját feltételezi. A c-Met aktivált expressziós mintázatot mutató csoportot más, független kutatócsoportok által közölt májcarcinoma és metasztatikus vastagbél tumorokban is azonosítani tudtuk.

4.7 A c-Met aktiváció a májrákokban megnövekedett mikrovaszkuláris denzitással és vaszkuláris inváziós frekvenciával társul.

A májkarcinómákban vizsgált klinikai és patológiai paraméterek közül a megnövekedett mikrovaszkuláris denzitás (átlagosan 90.8 ± 6.7 vs. 44.5 ± 6.2 , $p < 0.001$) és a vaszkuláris invázió frekvenciája ($\chi^2=4.0$, $p < 0.05$) mutatott szignifikáns, pozitív összefüggést a c-Met transzkripciós mintázattal. Azon betegek túlélése (átlagosan 35.1 ± 7.15 hónap) ahol a tumor c-Met aktivált mintázatot mutatott ugyancsak szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a többi betegé (70.3 ± 9.7 hónap).

4.8 A c-Met aktivált mintázaton alapuló predikciós modell 83-95% százalékos pontossággal képes a humán HCC betegek prognózisának megbecslésére.

Végül kidolgoztunk egy, a c-Met expressziós mintázaton alapuló predikciós modellt, amely képes a májkarcinoma betegek prognózisának megállapítására. A legjobb szeparációt biztosító 111 c-Met célgén listáját 60 teszt mintán (30 MET+ és 30 MET-) hatféle predikciós algoritmussal végzett elemzéssel határoztuk meg. A modellt egy, 79 mintából álló ellenőrző csoporton validáltuk. Az így létrehozott modell 85-98% közötti pontossággal tudta a májkarcinoma betegek két, az átlagos túlélésben jelentősen különböző csoportját azonosítani.

5. Megállapítások

5.1. A paraffinba ágyazott mintákból kinyerhető szöveti RNS integritása formalin, aceton és RNAlater fixálószerrel azonos mértékű. A 225 bp-nál rövidebb RNS szakaszok az archivált mintából hatékonyan felamplifikálhatók. Az immuhisztokémiai festések a formalin fixált mintákon megbízhatóbban működnek, mint a két másik fixálószer használata esetén.

5.2 A lineáris amplifikáció átlagos mértéke a T7T3 módszer használata esetén átlagosan 2×10^4 , az átlagos termék hossz 150 és 1,350 bp között tálható. Az aRNS termékből anti-sense szálú, aminoallyl jelölt cDNS minta szintetizálható.

5.3 Mikroarray elemzés során a T7T3 amplifikált minták jó korrelációt mutatnak mind a technikai replikátumokkal (Pearson $r=0.9$), mind a nem amplifikált mintákkal (Pearson $r=0.78$). Az amplifikáció során a májtumorok genotípusára jellemző expressziós mintázatok megőrződnek.

5.4 A HGF/c-Met útvonal aktivációja egér primer májsejtekben a korai válasz gének mellett a sejtadhézióban, a sejt motilitásban és a sejt váz felépítésében részt vevő gének expresszióját indukálja. A c-Met útvonal meghatározó szerepet játszik az oxidatív stressz válasz gének regulációjában. A c-Met knock-out hepatocitákban 67 gén expressziója permanens adaptációs különbséget mutat.

5.5 Az orthológ HGF indukált gének expressziója a humán májkarcinómákban illetve májmetasztázisok egy csoportjában a c-Met aktivációjával megegyező mintázatot mutat. Ezen tumorokban a mikrovaskuláris denzitás (átlagosan 90.8 ± 6.7 vs. 44.5 ± 6.2 , $p < 0.001$) és a vaszkuláris invázió frekvenciája ($\chi^2=4.0$, $p < 0.05$) szignifikánsan megemelkedett.

5.6 A c-Met aktivált mintázaton alapuló predikciós modell 83-95% százalékos pontossággal képes a humán HCC betegek prognózisának megbecslésére. A c-Met aktivációt mutató betegek túlélése (átlagosan 35.1 ± 7.15 hónap) mint a többi betegé (70.3 ± 9.7 hónap).

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények.

Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgerisson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. The Journal of clinical investigation 2006;116(6):1582-95. (IF: 15.754)

Kaposi-Novak P, Lee JS, Mikaelyan A, Patel V, Thorgerisson SS. Oligonucleotide mikroarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. Biotechniques 2004;37(4):580, 2-6, 8. (IF: 2.545)

Paska C, Bogi K, Szilak L, Tokes A, Szabo E, Sziller I, Rigo J Jr, Sobel G, Szabo I., Kaposi-Novak P, Kiss A, Schaff, Z. Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. Diagn Mol Pathol 2004;13(4):234-40. (IF: 2.292)

Lotz G, Kiss A, Kaposi Novak P, Sobel G, Schaff Z. Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. Journal of physiology, Paris 2001;95(1-6):417-22. (IF: 0.862)

Szabo E, Paska C, Kaposi Novak P, Schaff Z, Kiss A. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. Pathol Oncol Res 2004;10(1):5-11.

Kiss A, Lotz G, Kaposi Novak P, Schaff Z. Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. Orvosi hetilap 2002;143(2):83-6.

6.2 A disszertációtól független saját közlemények.

Glasz T, Hortovanyi E, Mozes G, Lotz G, Kaposi Novak P, Szik A, Kardos M, Sziller I, Nagy B, Ban Z, Toth A, Kassai I, Horkay F, Dudas G, Kadar A. Chlamydia pneumoniae in coronary bypass grafts of redo patients. The concept of the 'adventitial baseline infection'. Pathology, research and practice 2004;200(9):609-18. (IF: 0.681)

Podanyi B, Kiss A, **Kaposi-Novak P**, Paska C, Lengyel G, Horanyi M, Schaff Z, Horvath A. Hepatitis C virus RNA in the cutaneous eruption but not in the symptom-free skin from patient with prurigo simplex and chronic C hepatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol 2005;19(4):520-2. (IF: 1.638)

Podanyi B, Kiss A, **Kaposi-Novak P**, Paska C, Lengyel G, Horanyi M, Schaff Z, Horvath A. Hepatitis C virus RNA in the skin eruption from patients with prurigo and chronic hepatitis C. Orvosi hetilap 2004;145(47):2371-4.

Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, **Kaposi Novak P**, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. Breast Cancer Res 2005;7(2):R296-305. (IF: 4.026)

Kulka J, Tokes AM, **Kaposi-Novak P**, Udvarhelyi N, Keller A, Schaff Z. Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR - a comparison with immunohistochemical and FISH results. Pathol Oncol Res 2006;12(4):197-204. (IF: 1.241)