Molekuláris markerek vizsgálata differenciált pajzsmirigyrákokban

Doktori tézisek

Dr. Tóbiás Bálint Péter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Lakatos Péter D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hosszúfalusi Nóra Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kovács Gábor László Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Antal István Ph.D., egyetemi docens
Dr. Donáth Judit Ph.D., főorvos

Budapest
2014

Bevezetés

A pajzsmirigy az emberi szervezetben nélkülözhetetlen szerepet tölt be. Hatására az adott pillanatnak megfelelően gyorsulnak vagy lassulnak különböző szellemi és fizikai folyamataink. Ha valamilyen okból ez az egyensúly megbomlik, akkor beszélünk betegségről. Hazánkban a pajzsmirigy problémák népbetegségnek számítanak. A magyar emberek pajzsmirigye már gyermekkorban nagyobb, mint a megfelelő jódellátottságú országokban élő hasonló korosztályúaknak. A megfigyelések alapján mondhatjuk, hogy a nők körében sokkal gyakoribb az e mirigyet érintő megbetegedés, mint a férfiak esetében.

Az összes mirigyes szervünkkel kapcsolatban írtak már le valamilyen daganatos megbetegedést. Az utóbbi években a pajzsmirigy került górcső alá, ami részben a molekuláris biológia egyre növekvő térnyerésének is köszönhető. A teljes humán genom megszekvenálása óta jelentősen átalakult a tudományos világ és jelentős szemléletváltás következett be. Az új technológiák (NGS, next generation sequencing) révén az információáramlás felgyorsult, a költséghányadok jelentősen lecsökkentek és a kutatókon kívül már a mindennapok emberéhez is közelebb került a genetika. Korábban a genetikai kutatások, diagnosztikák középpontjában álló egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) vizsgálatát mára felváltotta a robosztus génmutációs panelek vizsgálata.

Célkitűzés

Jelen munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1.) Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen mutáció összefüggésének analízise a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.

2.) Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen mutációk összefüggésének analízise a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.

3.) Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen génátrendeződés összefüggésének analízise a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.

4.) Szomatikus onkogén PAX/PPARgamma génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen génátrendeződés összefüggésének vizsgálata a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.

5.) Az SFN, HMGA2, MRC2 gének expressziós mintázatának vizsgálata hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon.

6.) A CYP24A1 és CYP27B1 gén kifejeződésének vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon és összefüggést keresni a CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziós mintázata, valamint a tumor agresszivitása között.

7.) A SFN, HMGA2, MRC2 génexpresszió és CYP24A1 génkifejeződés összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon.

Módszerek

Minták gyűjtése

A felhasznált vizsgálati mintáinkat két nagy csoportra oszthatjuk: intraoperatív, friss szövetminták és formalinba fixált paraffinba ágyazott, archivált minták. A friss műtéti minták a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikájáról származtak, amelyekből patológus segítséggel kaptunk szövetdarabokat. A beágyazott mintákat a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézet, a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Általános Orvostudományi Kar Patológiai Intézet és az Országos Onkológiai Intézet archívumából származtak. Összesen 436 mintát gyűjtöttünk, 218 tumoros és 218 ugyanazon minta egészséges, a tumor által nem érintett területének részlete.A genetikai vizsgálatok etikai engedéllyel rendelkeztek: ETT-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU. Minden beteggel beleegyező nyilatkozatot töltettünk ki.

Nukleinsav (DNS, RNS) izolálás

A friss szövetmintákat a műtétet követően azonnal -80 ^{o}C-ra fagyasztottuk le, egészen a feldolgozás pillanatáig. A blokkokba ágyazott mintákat szobahőmérsékleten tároltuk. A fagyasztott (a tumor által nem érintett és a tumoros szövetből) minták feldolgozásának első lépése volt, hogy egy foszfáttal-pufferelt oldatban (PBS) aprítottuk fel a Fisher Scientific PowerGen 125 szövethomogenizátor (Fisher Scientific GmbH, Germany) segítségével. A genomiális DNS izolálása a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) felhasználásával, az RNS-t Roche High Pure RNA Isolation Kittel (Roche) nyertük ki a mintákból. Minden esetben a cég által előírt protokollt használtuk. A paraffinos minták (a tumor által nem érintett és a tumoros szövetrész) genomiális DNS-ét a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) segítségével állítottuk elő, míg az RNS-eket Roche High Pure RNA Paraffin Kittel (Roche) sikerült a legnagyobb tisztaságban és koncentrációban előállítani.

Szomatikus onkogén mutációk vizsgálata melting curve analízis segítségével

A DNS mutációk - *BRAF* codon 600 (rs113488022), *NRAS* codon 61 (rs79057879), *HRAS* codon 61 (rs28933406), *KRAS* codon 12 és 13 (rs121913535) – fluoreszcens detektálásához Roche LightCycler készüléket használtunk (Roche Light Cycler 2.0 Instrument, Roche). Mindegyik mutációhoz előre megtervezett primer párt és

oligonukleotid próbákat alkalmaztunk. A melting görbét a fluoreszcens jel hőmérséklet szerinti negaítv deriváltjából (-dF/dT) határozta meg a szoftver. A módszer mutációszenzitivitása 10% volt, ami azt jelenti, hogy minimum 10%-ot kell elérniük a mutáns alléltt hordozó sejtek arányának a mintában. Mindezt a pozitív kontrollok hígítási során végzett vizsgálatokra alapoztunk.

Szomatikus onkogén génátrendeződések vizsgálata real-time-PCR készülékkel

Az RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8ex9/PPARgamma, PAX8ex7/PPARgamma génátrendeződéseket valós-idejű PCR technikával vizsgáltuk ABI Prism 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) rendszeren. Gén-specifikus TaqMan próba alapú génexpressziós eljárást alkalmaztunk, ahol minden gén-specifikus szett tartalmazott egy 5' irányú és egy 3' irányú primert, valamint egy fluoreszcens jelölő molekulával ellátott próbát.

A „3 gén modell" expressziós mintázatának vizsgálata valós idejű, real-time-PCR készülékkel

A totál RNS-ek izolálását minden mintánál a Roche High Pure Total RNA Isolation kit felhszanálásával végeztük. 500 ng mennyiségű RNS-t használtunk a reverz transzkripcióhoz, a cDNS előállításakor. A különböző gének expresszióját (*ID CYP24A1: Hs00167999_m1, Applied Biosystems ID SFN: Hs.PT.51.20789121.g, ID MRC2: Hs.PT.51.20692535, ID HMGA2: Hs.PT.51.2803297, Integrated DNA Technologies*) Taqman próba alapú kvantitatív real-time PCR segítségével határoztuk meg. Endogén kontrollnak és az adatok normalizálásához a GAPDH gént használtuk. A kapott értékek alapján (threshold ciklusszám) a relatív kvantifikáció az Applied Biosystem 7500 készüléken SDS 1.3-as programmal történt.

CYP24A1 és CYP27B1 gének expressziójának vizsgálata real-time-PCR-rel

A kiválasztott gének (ID *CYP24A1*: Hs00167999_m1, ID *CYP27B1*: Hs00168017_m1) expressziós különbségeinek méréséhez előre megtervezett és validált gén specifikus TaqMan próbákat használtunk real-time RT-PCR készüléken (Applied Biosystems). Minden szett gén specifikus reverse és forward primereket, fluoreszcens jelölésű próbákat tartalmazott. A próbák egy exom-exom határon átnyúló területet öleltek fel és genomiális DNS-t nem mutattak ki.

Általános „housekeeping” – belső kontroll - génként a *GAPDH*–t (ID: Hs99999905_m1) használtuk az adatok normalizálásához.

A relatív kvantifikációs vizsgálatot az adatok összegyűjtése után (küszöb/threshold ciklusszám, Ct) a 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. A gén specifikus mRNS relatív mennyiségét (RQ) a dCt átlagértékéből (target gén Ct - endogén kontroll gén Ct) határoztuk meg 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) a gyártó ajánlásai alapján.

A tumoros minták relatív génexpresszió változásánál a kontroll szövetekhez képest vizsgáltuk és cutoff értéknek a kétszeres növekedés vagy felére csökkenést fogadtuk el.

Immunhisztokémia

A CYP24A1 fehérje mennyiségi detektálásához pajzsmirigyből származó, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szöveti (FFPE) mintákat vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. A vizsgálathoz elsődleges antitestként tisztított, anti-humán CYP24A1 nyúl poliklonális antitestet (Prestige Antibodies, Sigma-Aldrich; 1:200) használtunk. A folyamat első lépése során a 2 um-es vastagságú pajzsmirigyszövetet deparaffináltuk, majd az endogén peroxidáz aktivitást 1,5% (v/v) hidrogen-peroxid tartalmú etanollal gátoltuk. Az antigének feltárásához szükséges hőkezelést elektromos kukta (Avair IDA) alkalmazásával, 10 mmol/l (pH 10,5) TRIS pufferben végeztük el. A fehérjék pH 7,4-es TRIS-puffer oldatban történő blokkolása után 5%-os (w/v) alacsony zsírtartalmú tejpor oldatban szobahőmérsékleten, 70 percig inkubáltuk a mintát. A detektálást Novolink polymer kittel (Leica Biosystems/Novocastra) végeztük. A sejtmagok festéséhez Mayer-féle hematoxylin oldatot használtunk. Az immunhisztokémiai festéseket 4 csatornás Freedom Evo (TECAN, Mannedorf, Svájc) folyadékkezelő rendszeren végeztük.

Statisztikai analízisek

- **Szomatikus onkogén mutációk statisztikai analízise differenciált pajzsmirigy carcinomákban**

A vizsgálati mintáinkat három csoportra osztottuk fel a klinikai és szövettani adatok alapján, majd összefüggést kerestünk a csoportok és a genetikai eltérések jelenléte között.

1. csoport: azon minták, amelyek metastasist, érbetörést nem mutattak és a tumor mérete 10 mm vagy kisebb volt
2. csoport: azon minták, amelyek metastasist, érbetörést nem mutattak és a tumor átmérője 10 mm-t meghaladta
3. csoport: azon minták, amelyek metastasist, érbetörést mutattak és a tumor átmérője 10 mm-t meghaladta

Az így kapott adatok között Khi-teszt segítségével kerestünk szignifikáns változásokat. Mindehhez az SPSS Statistic 20 programcsomagot használtuk.

- **Génexpressziós vizsgálatok statisztikai analízise papillaris carcinomákban (PTC-kben)**

A CYP24A1 és CYP27B1 gének expressziós szintjének változását 100 papillaris carcinomás mintán vizsgáltuk, amelyekben a „saját" egészséges szövetpárhoz viszonyítottuk az expressziós különbségeket.

A statisztikai analízis során non-parametrikus eljárást alkalmazva, Mann-Whitney U-tesztet használtunk. Az eredményeknél a p-érték 0,05 vagy kisebbet fogadtuk el szignifikánsnak. Pearsons-korrelációval vizsgáltuk az állandó változók (CYP24A1 expresszió és a PTC diagnóziskori életkor) közötti összefüggéseket

Négy funkcionális alcsoportot alkottunk a CYP24A1 overexpresszált, csökkent expressziót mutató és változást nem mutató minták kiértékeléséhez:

1. csoport: valamely szomatikus onkogén mutáció (BRAF, HRAS, NRAS, KRAS) és/vagy génátrendeződés (RET/PTC1, RET/PTC3) jelenléte
2. csoport: klasszikus papillaris carcinoma vagy más szövettani variánsa (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulalt és microcarcinoma)
3. csoport: egyéb pajzsmirigyet érintő betegség a PTC mellett (Hashimoto thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis)
4. csoport: nyirokcsomó áttétet és/vagy érbetörést mutató PTC

Khi-tesztet használtunk a tumor minták eloszlásának vizsgálatához a CYP24A1 expresszió (csökkent, emelkedett, nem változott) tekintetében.

Egyváltozós Mann-Whitney U-tesztet is lefuttattunk az adatok vizsgálata során, de nem kaptunk használható eredményeket, ezért multivarációs adatelemzést végeztünk.

- **Főkomponens analízis**

A főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) egy standard technika, amely széles körben alkalmazható az orvosbiológiai kutatásokban, különösen microarray és egyéb génexpressziós adattömegek statisztikai kiértékelésében. A módszer összegzi a multivariációs adatrendszereket néhány fontos, egymástól független és az eredeti adatstruktúrát jól tükröző dimenzióba, mely dimenziókat komponenseknek nevezünk. Minden komponens az összvariancia egy töredéke. A kvantitatív RT-PCR adatok feldolgozása során standardizált PCA metodikát használtunk, vagyis minden változót (génmutációt, demográfiai, hisztológiai, klinikai adatot) egyforma súllyal szerepeltettünk az elemzésben. Az eredmények grafikus ábrázolása ordinációs diagramon, illetve kettős szórásdiagramon (biplot) történt. A személyek koordinátáit az eigenvektorokból kapjuk meg, ugyanakkor a gének koordinátáit a változók komponensekkel való korrelációjából számolt értékei adják. Ez az ábrázolásmód megengedi a tumoeos vs. kontroll mintacsoportok és a gének, ill. CYP24A1 expresszió kórfolyamati jelentőségének egyidejű értékelését. Az egy csoportba tartozó személyek konvex sokszögekbe zárhatók, amely vizualizációs technika alkalmazása egyértelműbbé teszi a csoportok elkülönülését a diagramon. A PCA szelektálja azokat a géneket, amelyek a leginkább felelőssé tehetők a beteg és kontroll csoportok közötti különbségekért. Scree diagram segítségével döntöttük el, hogy egy komponens valóban hasznos információkat foglal magában vagy az csupán véletlenszerű eltérés az adatokban. Így meghatároztuk azt a töréspontot, ahol az eigenértékek nagyon lassan csökkenni kezdenek. A számításokat a SYN-TAX 2000 programcsomag felhasználásával készítettük.

Eredmények

- **Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon**

A BRAF mutáció esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor 50,5± 15,2), 148 pedig női (átlag életkor 48,6 ± 16,5) betegtől. A vizsgálat során a differenciált pajzsmirigy tumorok között 7 esetben találtunk dupla genetikai eltérést (1 KRAS, 3 NRAS mutáció és 3 RET/PTC génátrendeződés), 91 tumoros minta hordozta a gén defektusát és 127 mintában nem mutattunk ki eltérést. Találtunk 4 olyan follicularis carcinomát, amely BRAF mutációt hordozott. Az összes tumoros mintát figyelembe véve 41,7%-uk hordozott BRAF mutációt. Egy egészséges, kontroll mintában sem mutattunk ki genetikai elváltozást. Megvizsgáltuk a PTC altípusai és a BRAF mutáció összefüggését és a statisztikai analízis során nem találtunk kapcsolatot a genetikai adatok, ill. a betegség súlyossága között. Az megfigyelhető volt, hogy a BRAF mutáció magasabb arányban volt jelent a tall cell variánsú PTC-ben, de szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni az altípusok és a mutációk gyakorisága közt.

- **Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon**

A RAS géncsalád mutációinak esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor 50,5± 15,2), 148 pedig női (átlag életkor 48,6 ± 16,5) betegtől. Az eredményeink alapján PTC-ben 8 (4,1%), FTC-ben pedig 6 (28,6%) RAS mutációt sikerült kimutatni. Öt esetben kettős mutációt detektáltunk: egy KRAS és BRAF, három NRAS és BRAF, valamint egy NRAS és RET/PTC3. Altípusokra bontva a PTC-ben két HRAS, egy KRAS és 5 NRAS elváltozást detektáltunk. A follicularis carcinoma esetében egy minta volt HRAS és öt minta pedig NRAS pozitív.

- **Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon**

A RET/PTC génátrendeződések esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor 50,5± 15,2), 148 pedig női (átlag életkor 48,6 ± 16,5) betegtől. Az összes tumoros mintát figyelembe véve a PTC-s esetekben kilenc RET/PTC1 és egy RET/PTC3

génátrendeződést sikerült kimutatni. Négy esetben volt kettős genetikai elváltozás, mégpedig 3 RET/PTC1 és BRAF, valamint egy RET/PTC és NRAS mutáció. Az összes tumoros PTC mintára vonatkoztatva elmondhatjuk, hogy 5,1%-uk hordozta ezt a variációt. Az FTC-esetében csak egy RET/PTC3 génátrendeződést találtunk, mai az összes mintára nézve 4,8%-os gyakoriságot jelent. Ha mindkét carcinoma típust együttesen vizsgáljuk, akkor elmondható, hogy 11 mintában (5,0%) sikerült kimutatni valamely RET/PTC génátrendeződést.

- **Szomatikus onkogén PAX/PPARgamma génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon**

A PAX/PPARgamma génátrendeződés esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor 50,5± 15,2), 148 pedig női (átlag életkor 48,6 ± 16,5) betegtől. Egy tumoros és kontroll mintában sem sikerült PAX/PPARgamma génátrendeződést kimutatni.

Az SFN, MRC2, HMGA2 gének expressziós mintázatának vizsgálata hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

A „3 gén-modell" vizsgálatát 58 papillaris carcinoma és a hozzá tartozó ép szövetmintán vizsgáltuk, amelyből 23 származott férfi betegtől, 35 pedig női betegtől (18-81 éves korig, átlag életkor 47,7 ± 12,4 év).

A szomatikus onkogén mutációt (BRAF, NRAS, HRAS és KRAS) hordozó és mutációt nem tartalmazó minták expresszióját összehasonlításakor a szomatikus mutációra pozitív tumor minták nagyobb aránya mutatott emelkedett expressziót az SFN (69,7% vs. 57,1%) MRC2 (59,4% vs. 45,0%) HMGA2 (60,6% vs. 42,9%) gének esetén, de statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtunk egyik gén vonatkozásában sem a mutációkra negatív tumor mintákhoz viszonyítva.

A papillaris carcinoma különböző altípusai/variánsai (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulalt és microcarcinoma) *vs.* klasszikus PTC közötti eltéréseket vizsgálata során az SFN (65,2% vs. 64,5%) és HMGA2 (56,5% vs. 51,6%) gének nagyobb százalékban mutattak fokozott expressziót a különböző PTC szövettani altípusokban. Ezen változások szignifikáns eltérést nem mutattak.

A PTC-n kívül még egyéb pajzsmirigy betegséggel bíró (Hashimoto-thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis), illetve a csak PTC-s betegek expressziós eredményeit hasonlítottuk össze, ahol a HMGA2 (75,0% vs. 44,7%) és MRC2 (57,1% vs. 52,6%)

gének esetében emelkedő trendet lehetett megfigyelni az egyéb pajzsmirigy betegséggel társult PTC szövetminták vizsgálatakor, szemben az SFN (56,3% vs. 68,4%) génnel, amely a társbetegség nélküli csoportban mutatott nagyobb expressziós aktivitást. Az expressziós változások $p<0,05$ szignifikancia értéket nem érték el.

Összevetettük az agresszívabb tulajdonságokkal rendelkező és a kevésbé malignus minták expressziós mintázatait. Agresszív tulajdonságúak közé soroltuk a nyirokcsomó áttétet és vascularis inváziót mutató tumorokat. Minden más tumor az alacsonyabb agresszivitású, kevésbé malignus csoportba került. Megfigyelhető volt, hogy az SFN gén (82,6% vs. 51,6%) és HMGA2 gén (65,2% vs. 45,2%) expressziója jelentősen megemelkedett a rosszabb prognózisú daganatok esetében, szemben az alacsonyabb malignitásfokú tumorokkal. Az expressziós értékek szignifikáns változást nem mutattak a vizsgálat során.

- **A CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziójának vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon**

Összesen száz (31 férfi, 69 nő) papillaris pajzsmirigy carcinomájában és ezek egészséges, tumor által nem érintett szöveti párjában vizsgáltuk a CYP24A1 és CYP27B1 gének relatív expressziós mintázatát.

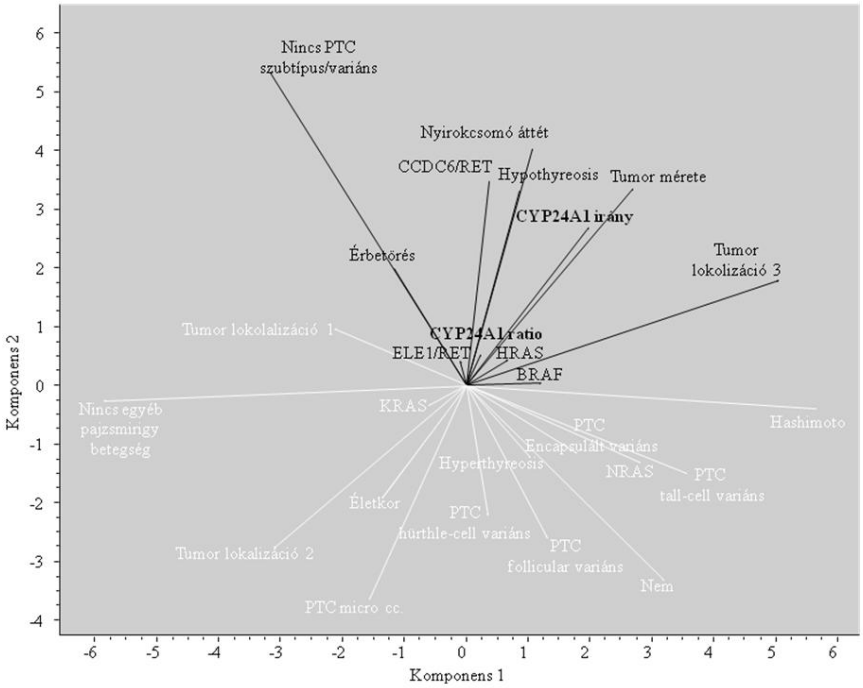
A CYP24A1 mRNS expressziója 52 esetben megemelkedett a tumoros mintában az egészséges szövethez viszonyítva. Volt olyan eset, ahol az ép szövethez képest több mint 1000-szeres emelkedést detektáltunk. Ezen mintákban a CYP24A1 specifikus mRNS relatív mennyiségének emelkedése statisztikailag szignifikanciát mutatott. 24 malignus minta alacsonyabb CYP24A1 specifikus génexpressziós értékeket adott, mint az ép szövetpárja. 13 személyben nem volt detektálható CYP24A1 expresszió sem a tumoros, sem egészséges szövetben.

Nem volt szignifikáns összefüggés a CYP27B1 gén expressziójában a tumor minták és kontroll párjaik közt. A minták több mint 90%-ában a CYP27B1 expresszió nem érte el a cutoff értéket, azaz nem nőttek 2-szeresükre vagy nem csökkentek a kontroll minták értékeinek felére. Az áltagos változás 0,88±0,44 volt.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei egy az egyben megerősítették a real-time PCR által kapott eredményeket, emelkedett CYP24A1 expresszióhoz mindig emelkedett fehérjekifejeződés párosult.

A CYP24A1 expresszió tekintetében emelkedő tendenciát figyeltünk meg a PTC altípusaival összefüggésben, ellenben a statisztikai analízis (Khi-négyzet teszt) nem erősítette ezt meg, szignifikáns változásokat nem kaptunk, de a következő trendeket figyeltük meg: Magasabb CYP24A1 expresszió volt megfigyelhető, ha a tumorszövet szomatikus onkogén mutációt hordozott (60,7% vs. 54,5%). A CYP24A1 expresszió emelkedését tapasztaltunk a klasszikus PTC-s mintákban a PTC variánsokhoz képest (65,3% vs. 50,0%). Ha azon PTC-s eseteket, ahol nem volt társbetegség, hasonlítjuk össze azon esetekkel, ahol pajzsmirigy egyéb megbetegedése is társult, ott a csak PTC-s mintákban mértünk magasabb CYP24A1 kifejeződést (59,4% vs. 56,0%).

Végezetül a CYP24A1 overexpresszió jelenléte azon PTC mintákra volt jellemző, ahol nyirokcsomó áttét és/vagy érbetörés volt megfigyelhető (65,7% vs. 52,9%).



1. ábra PCA főkomponens analízis a CYP24A1 expresszió vonatkozásában, ahol komponens 1 és komponens 2 közötti összefüggéseket ábrázoltuk.

A főkomponens (PCA) diagram 26 általunk vizsgált paraméter (demográfiai, klinikai, hisztológiai és genetikai) változásait és összefüggéseit mutatja 89 PTC-s mintára vonatkoztatva. Az első két eigenvektor 10,4% és 9% az összes változóra. Jelentős pozitív korreláció látható a CYP24A1 expressziós emelkedés (CYP24A1 irány) és a tumorok malignitásával összefüggésben álló változók csoportja közt (nyirokcsomó

áttét, tumor mérete, érbetörés), valamint kismértékű összefüggés mutatkozik a különböző szomatikus onkogén mutációkkal (BRAF, HRAS, RET/ELE1). A PTC-s csoportba csak azon minták kerültek be, amelyek klasszikus PTC-k és nem volt semmilyen pajzsmirigyet érintő társbetegség az anamnézisben. (1. ábra)

- **A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió és CYP2A1 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon**

A szomatikus onkogén mutációt (BRAF, NRAS, HRAS, KRAS és RET/PTC génátrendeződés) hordozó és mutációt nem tartalmazó minták expresszióját hasonlítottuk össze. A CYP24A1 gén esetében nem volt jelentős változás a két csoport között, a „3 gén-modell" expressziója enyhe növekedést mutatott az onkogén mutációt hordozó minták esetében.

A PTC különböző altípusai/variánsai (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulalt és microcarcinoma) *vs.* klasszikus PTC közötti összefüggéseket vizsgáltuk, Az expressziós eredmények szignifikáns változás nem mutattak, az MRC2 gén (60,0% vs. 45.5%) és a CYP24A1 gén (66,7% vs. 50,0%), ahol emelkedett expresszió jelentkezett a klasszikus PTC csoportban. A többi génnél az emelkedett tendencia a PTC variánsok között figyelhető meg (SFN (65,2% vs. 64,5%) és HMGA2 (56,5% vs. 51,6%).

A PTC-n kívül még egyéb pajzsmirigy betegséggel bíró (Hashimoto-thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis), illetve a csak PTC-s betegek expressziós eredményeit hasonlítottuk össze, ahol a HMGA2 (75,0% vs. 44,7%) és MRC2 (57,1% vs. 52,6%) gének esetében szignifikáns változást nem, ugyanakkor emelkedő trendet lehetett megfigyelni a pluszban még valamilyen pajzsmirigy betegséggel rendelkező betegeknél, ellenben az SFN (68,4% vs. 56,3%) és CYPP24A1 (65,8% vs. 47,0%) génekkel, ahol a csak PTC-s eseteknél volt megfigyelhető ez a nem szignifikáns, növekvő változás.

Összevetettük az agresszívabb tulajdonságokkal (nyirokcsomó áttétet és vascularis invasiot/érbetörést mutató) rendelkező és a kevésbé malignus minták expressziós mintázatait. Megfigyelhető változások szignifikáns különbséget nem mutattak. Az SFN gén (82,6% vs. 51,6%) expressziója jelentősen, a HMGA2 (65,2% vs. 45,2%) és CYP24A1 (64,0% vs. 54,5%) gének expresszója kissé emelkedett a rosszabb prognózisú daganatok esetében, szemben az alacsonyabb malignitásfokú tumorok csökkent expressziójával, amely mindegyik csoportra igaz volt.

Következtetések

Az általunk elvégzett vizsgálatokon keresztül képet kaptunk a hazai pajzsmirigydaganatok genetikai variabilitásáról. Elmondhatjuk, hogy néhány kivétellel Magyarországon is az irodalmi adatoknak megfelelően alakult a mutációk és génátrendeződések aránya. A RAS mutációk aránya follicularis carcinomában jóval a nemzetközi szint alatt maradt. A legnagyobb meglepetést az adta, hogy hazánkban egyáltalán nem jellemző a PAX/PPARgamma génátrendeződés a follicularis pajzsmirigyrákokban. Ezen eltérések pontos okát nem tudjuk, de feltételezéseink szerint a jódellátottsággal lehetnek összefüggésben.

Továbbá a komplex génexpressziós vizsgálatok megerősítettek bennünket abban, hogy a D-vitamin neutralizálásában szerepet játszó CYP24A1 gén emelkedett expressziót mutat agresszívabb (nyirokcsomó áttét, érbetörés) PTC daganatokban és pozitívan korrelál az esetlegesen jelen lévő genetikai mutációkkal, valamint a tumor méretével. A relatív magas mintaszámon végzett vizsgáltunk eredményei alapján a D3-vitamin inaktiválásában szerepet játszó CYP24A1 gén aktivitása jelentősen változik PTC-s mintákban az egészséges kontroll szövet expressziójához képest. A PCA analízis során pozitív korrelációt találtunk a CYP24A1 expressziós arány és a pontmutációk (BRAF, HRAS), génátrendeződések (RET/PTC1) megléte és a tumor negatív tulajdonságai közt. Ezek alapján felmerül, hogy a CYP24A1 enzim közvetlenül is részt vehet a pajzsmirigy tumorok kialakulásában.

A differenciált pajzsmirigy daganatok jelentős százalékát teszik ki az összes pajzsmirigyráknak. A genetikai alapkutatásoknak köszönhetően egyre több genetikai tényezőt ismerünk meg a tumor képződés folyamatában. Ezen ismereteink alapját képezhetik új diagnosztikus módszereknek és új gyógyszermolekulák fejlesztésének.

A pajzsmirigy „hideg”-göbök napi diagnosztikáját ellátó ultrahang vezérelt aspirációs citológiai vizsgálatokat célszerű lenne kiegészíteni molekuláris biológiai vizsgálatokkal is. Ez azért lenne fontos, mert a bizonytalan eredmények számát még jobban le lehetne csökkenteni, ill. a már genetikai elváltozásokat mutató, amúgy mikroszkóp alatt egy benignus strúma képét mutató göböt már a daganat manifesztálódása előtt el lehetne távolítani.

A munkánk során beállított genetikai módszerek megteremtették az alapját ezen eljárások hazai, rutinszerű bevezetésének.

Az általunk vizsgált onkogének a MAP-kináz útvonal működésében, ezáltal a sejtek osztódásában, differenciálódásában és apoptózis indukálásban játszanak fontos szerepet. A farmakogenomika rohamos fejlődésének köszönhetően a személyre szabott orvoslás egyre inkább szerepet kap a betegségek, daganatok gyógyításában. Nagy áttörés volt ilyen szempontból például az EGFR-gátló cetuximab bevezetése a metastaticus colon carcinomák kezelésében. A BRAF pozitív melanoma gyógyítására használt BRAF-gátló vemurafenib is ígéretes hatással kecsegtet, ám egyelőre még a pajzsmirigy tumorok nem szerepelnek az indikációs területek között. Az a tény, hogy ismerjük melyik daganat típusra melyik onkogén szomatikus mutáció jellemző, alapjául szolgálhat új gyógyszermolekulák fejlesztésének. Munkánk tükrében érdemes lenne elgondolkodni egy CYP24A1 enzimet gátló vegyület kifejlesztésén, ezáltal lehetőség nyílna a calcitriol antitumor hatását kihasználni.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk :

Balla, B., J.P. Kosa, **B. Tobias**, C. Halaszlaki, I. Takacs, H. Horvath, G. Speer, Z. Nagy, J. Horanyi, B. Jaray, E. Szekely, and P. Lakatos (2011) *Marked increase in CYP24A1 gene expression in human papillary thyroid cancer.* **Thyroid**. **21**(4): p. 459-60.

Tobias, B., B. Balla, P.J. Kosa, J. Horanyi, I. Takacs, E. Bolony, C. Halaszlaki, Z. Nagy, G. Speer, B. Jaray, E. Szekely, R. Istok, and P. Lakatos (2011) *[Comparative study of somatic oncogene mutations in normal thyroid tissues and thyroid neoplasms].* **Orv Hetil**. **152**(17): p. 672-7.

Balla B*; **Tobias B***; Kosa JP; Podani J; Horvath P; Nagy Z; Horanyi J; Jaray B; Szekely E; Krenacs L; Arvai K; Dank M; Putz Z; Szabo B; Szili B; Valkusz Z; Vasas B; Gyori G; Lakatos P; Takacs I (2014) *Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer.* **JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION** (epub)

(*= a szerzők azonos mértékben vettek részt a cikk megszületésében)

A disszertációtól független publikációk:

Lazary A, Kosa JP, **Tobias B**, Lazary J, Balla B, Bacsi K, Takacs I, Nagy Z, Mezo T, Speer G, Lakatos P (2008) Single nucleotide polymorphisms in new candidate genes are associated with bone mineral density and fracture risk. **EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY** 159:(2) p. 187-196.

Bakos B, Takács I, Ternai Z, Nagy Zs, Kósa PJ, Balla B, **Tóbiás B**, Halászlaki Cs, Szili B, Lakatos P (2011) *A hyperthyreosisok radiojódkezelésének hosszú távú hatékonysága* **MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM** 64:(5) pp. 289-293.

Balla B, Vaszilko M, Kosa J, Podani J, Takacs I, **Tobias B**, Nagy Z, Lazary A, Lakatos P (2012) *New approach to analyze genetic and clinical data in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw.* **ORAL DISEASES** 18:(6) pp. 580-585.

Horvath Evelin, Lakatos Peter, Balla Bernadett, Kosa Janos Pal, **Tobias Balint**, Jozilan Hasan, Borka Katalin, Horvath Henrik Csaba, Kovalszky Ilona, Szalay Ferenc (2012) *Marked Increase of CYP24A1 mRNA Level in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Following Vitamin D Administration* **ANTICANCER RESEARCH** 32:(11) pp. 4791-4796.

Árvai K, Kósa J, Horváth P, Balla B, **Tóbiás B**, Takács I, Nagy Zs, Lakatos P (2013) *Osteogenesis imperfecta rutin genetikai diagnosztikája új generációs szekvenálási (NGS) technológiával* **MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM** 66:(5) pp. 280-284.

Bakos B, Takacs I, Nagy Z, Kosa JP, Balla B, **Tobias B**, Halaszlaki C, Szili B, Lakatos P (2013) *Long term efficacy of radioiodine treatment in hyperthyroidism.* **EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES** 121:(8) pp. 494-497.

Arvai K, Horvath P, Balla B, Tokes AM, **Tobias B**, Takacs I, Nagy Z, Lakatos P, Kosa JP (2014) *Rapid and cost effective screening of breast and ovarian cancer genes using novel sequence capture method in clinical samples.***FAMILIAL CANCER** epub: p. §.

Balla B, Arvai K, Horvath P, **Tobias B**, Takacs I, Nagy Z, Dank M, Fekete G, Kosa JP, Lakatos P (2014) *Fast and Robust Next-Generation Sequencing Technique Using Ion Torrent Personal Genome Machine for the Screening of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Gene.* **JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE** 53:(2) pp. 204-210.