

# Új, NGS alapú módszer kidolgozása a pajzsmirigy hideg göbök malignizálódásának előrejelzésére

Doktori tézisek

**Kocsis-Deák Barbara**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Pikó Henriett, Ph.D., tudományos munkatárs

Dr. Péterfia Bálint Ferenc, Ph.D., tudományos  
főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Kovács Gábor László, Ph.D., főorvos

Budapest  
2019

## 1. BEVEZETÉS

A pajzsmirigy működése minden életfolyamatunkra hatással van, az alapanyagcserét szabályozza, ezáltal az emberi szervezetben nélkülözhetetlen szerepet tölt be. Ha működésében bármilyen zavar áll be, egész szervezetünk normál ritmusa borul fel.

Hazánkban a pajzsmirigy betegségei a lakosság nagy hányadát érintik, ezért népbetegségnek tekintjük. A legismertebb pajzsmirigy rendellenességek (alul-és túlműködés, gyulladások) gyakori előfordulása mellett ma a pajzsmirigydaganatok incidenciája is folyamatosan növekszik világszerte. Hazánkban a pajzsmirigyrák a leggyakrabban előforduló endokrin tumor, melyek többnyire ún. hideg göbökben alakulhatnak ki, ezek prevalenciája pajzsmirigyben 4-7%; azonban e göböknek csak egy része (5-10%) válik később tumorossá. A pajzsmirigy rosszindulatú daganatainak legnagyobb része (90%) a folliculus epithelsejtekből származó jól differenciált carcinomák (DTC) közé tartozik, amelynek 70-80%-a papillaris (PTC) pajzsmirigy tumor.

A klinikai gyakorlatban jelenleg alkalmazott eljárások sokszor csak megkétszerezve jelzik a daganatos elváltozásokat. Napjainkban szükségessé vált egy olyan célzottabb, korai felismerést lehetővé tevő vizsgálómódszer bevezetése, mely alkalmas a klinikai diagnosztika pontosítására és a malignizálódási hajlam megítélésének segítésére is. A genetika és az informatika

tudományának robbanásszerű fejlődését kihasználva nyílt meg az út a molekuláris géndiagnosztikai módszerek legújabb generációja előtt, mely teret nyújt az újgenerációs szekvenálási (NGS) technikák használatára és innovatív daganat diagnosztikai eljárások kialakítására.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Munkacsoportunk 2010-ben egy 8 onkogén vizsgálatán alapuló panelt fejlesztett ki, mely egy adott pajzsmirigy elváltozás pontosabb diagnózisához és az esetleges malignitás előrejelzéséhez járul hozzá. Ezután egy kiterjedtebb, pontosabb és költséghatékonyabb módszer kifejlesztését tűztük ki célul.

1. Elsődleges célunk egy újgenerációs szekvenáláson alapuló genetikai diagnosztikai eljárás kialakítása volt, amely képes megjósolni a még citológiaiilag benignus hideg göbök malignizálódásának kockázatát, illetve a bizonytalan citológiai kategóriába sorolt eseteknél segíthet a végleges diagnózis felállításában.

2. A fenti cél megvalósítása érdekében, először egy új génpanel kialakítását tűztük ki célul.

3. Az új génpanelt szövettanilag igazolt tumoros és nem tumoros mintákon terveztük validálni.

4. Az új génpanelt vékonytűbiopsziás minták értékelésére is alkalmassá kívántuk tenni.

5. Célunk volt továbbá az, hogy az általunk kifejlesztett módszer nemzetközi viszonylatban is a legszélesebb körű és leginkább költséghatékony géndiagnosztikus panel legyen a pajzsmirigy daganatok korai, hideg göbből történő előrejelzésére és a bizonytalan citológiai eredmények kiegészítésére, esetleges terápiás konzekvenciákkal együtt.

### **3. MÓDSZEREK**

#### **3.1. Géndiagnosztikai panel kidolgozása**

Az általunk kifejlesztett NGS metodika a Thermo Fisher Scientific által forgalmazott Ion Torrent PGM™ rendszeren alapul. Egy egyedi AmpliSeq hot spot panelt terveztünk, amely összesen 23 gént (*AKT1*, *APC*, *AXIN1*, *BRAF*, *C16orf3*, *CTNNB1*, *DICER1*, *EIF1AX*, *GNAS*, *HRAS*, *IDH1*, *KRAS*, *LPAR4*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RET*, *SMAD4*, *TERT*, *TP53*, *TSHR* és *VHL*) és azokon belül 568 ismert onkogén mutációt tartalmaz. A vizsgálatba bevont géneket, illetve mutációkat korábban, a nemzetközi szakirodalomban már leírták pajzsmirigy daganatokkal kapcsolatban. Az újgenerációs szekvenáláson alapuló géndiagnosztikai panel képes pajzsmirigy szöveti mintából, egy időben számos, a pajzsmirigydaganat kialakulásában szerepet játszó gén vizsgálatára.

#### **3.2. Pajzsmirigy minták gyűjtése**

Munkánk során kétféle pajzsmirigy mintával dolgoztunk.

1. Módszerünk optimalizálásához és validálásához hisztológiailag igazoltan papillaris carcinomában szenvedő páciensek pajzsmirigyszövetéből, műtéti beavatkozás során vett szövetet analizáltunk. Összesen 40 PTC-s páciensből (31 nő és 9 férfi) gyűjtöttünk be intraoperatív, friss szövetmintákat. Minden beteg daganatos szövetrészből és

normál, szövettanilag egészséges pajzsmirigyszövetéből is megtörtént a mintavétel. Összesen 67 darab pajzsmirigy minta vizsgálata történt meg, melyek közül 39 darab papillaris pajzsmirigy daganatból, míg 28 darab szövettanilag egészséges pajzsmirigyszövetből származik. 27 páciens esetében a PTC-s és normál pajzsmirigy részből származó szöveti minták is megfeleltek a vizsgálati feltételeknek, ezek mellett 12 páciensről csak a carcinomás, míg 1 páciensről csak a normál szövetből származó minta került be vizsgálatunkba.

2. A kialakított eljárásunkat ezután malignitásra gyanús göbökből, ultrahang-vezérelten vékonytű-aspirációs biopszia (fine needle aspiration biopsy, FNAB) segítségével vett mintákon is teszteltük. Összesen 51, ultrahanggal gyanúnak ítélt pajzsmirigy göbből származó FNAB mintát analizáltunk.

### **3.3. Genomiális DNS izolálása**

A szöveti mintákból és az FNAB mintákból származó sejtekből is genomiális DNS-t izoláltunk a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Indianapolis, IN, USA) segítségével, gyári protokoll alapján. Az izolált DNS minőségét NanoDrop spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA) 260/280 nm-en mértük meg és csak a megfelelő minőségű DNS-t fogadtuk el (ahol a 260/280 arány legalább 1,8 volt). A DNS

koncentrációját a Qubit dsDNA HS assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg, és a túl alacsony (<10 ng/ul) koncentrációjú mintákat kizártuk a további vizsgálatból (szekvenáláshoz min. DNS koncentráció: 10 ng/ul).

### **3.4. Újgenerációs szekvenálás**

A szekvenálás laboratóriumi munkafolyamata három fő lépésből áll: könyvtárkészítés, emulziós PCR és szekvenálás.

A könyvtárkészítés során az izolált DNS specifikus régióit felsokszorozva DNS könyvtárat készítettünk.

Az emulziós PCR során a DNS könyvtármolekulákat, meghatározott koncentrációban és arányban, az Ion Szekvenáló Részecskék (ISP, szekvenáló gyöngyök) felszínére kötöttük és felsokszoroztuk. A reakcióba bekerülő könyvtárakat nem egyenként, hanem kis csoportokban (5 minta/csoport) kezeltük ettől a lépéstől kezdve, egészen a szekvenálás végéig. Azon gyöngyöket, amelyek valamilyen okból nem hordoztak a felszínükön szekvenálható DNS szakaszt, egy dúsítási eljárás segítségével eltávolítottuk az elkészült templát oldatból.

A teljes eljárás utolsó, laboratóriumban történő fázisa maga a szekvenálási folyamat. Az elkészített ISP gyöngyöket szekvenáló chipbe töltöttük és meghatároztuk a gyöngyök

felszínén lévő DNS fragmensek nukleotid szekvenciáját az Ion Torrent PGM™ szekvenátor segítségével.

### **3.5. Genetikai adatok elemzése**

A szekvenálás végére hatalmas mennyiségű, több gigabájtnyi adatot kapunk, melynek értelmezéséhez, kiértékeléséhez szoftveres segítségre van szükségünk (platform-specifikus Torrent Suite v5.0.4 szoftver). A szoftveres elemzés alapján felfedezett genetikai eltéréseket ezután diszkriminancia elemzésnek (canonical variate analysis, CVA) vetettük alá. Ennek segítségével további, pontosabb összefüggéseket szerettünk volna felfedezni, melyek alapján létrehozhatunk egy olyan score rendszert, aminek a segítségével el tudjuk különíteni a tumoros pajzsmirigy mintákat a jóindulatú elváltozásoktól.

Vizsgálatunk során a validálási mintákból származó adatokat szoftveres elemzés után statisztikailag is analizáltuk, míg az FNAB mintákból származó eredményeket csupán szoftveres elemzésnek vetettük alá.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A pajzsmirigy szövetminták mutációs profilja

A 67 pajzsmirigy szövetmintában összesen 177 nem-szinonim, vagyis aminosavcserevel járó variánst azonosítottunk, ezek közül 145 SNV (142 missense és 3 nonsense), 31 INDEL eltérés (27 inszerció, 3 delécio és 1 frameshift delécio), és 1 missense MNV különíthető el. E genetikai eltérések közül ötvenet már leírtak a COSMIC adatbázisban. Jelen vizsgálatunkkal további 127 új variánst azonosítottunk a célzott szekvenciák körül.

#### 4.1.1. *Tumoros szövetben talált mutációk*

A PTC-s szövetmintákban összesen 102 szomatikus mutációt azonosítottunk 20 génben. A legpolimorfabb génnek az *AXINI* mutatkozott (16 különböző variánssal). A leggyakrabban előforduló mutáció a már jól ismert *BRAF* c.1799T>A (V600E) volt, ami 14 papillaris pajzsmirigy daganatszövetben fordult elő. Átlagosan egy PTC-s mintában 5,74 darab mutációt figyeltünk meg. Tizenkilenc nukleotid változás volt a legmagasabb eltérésszám, amit felfedeztünk egy tumoros mintában, és 2 olyan PTC-s mintánk volt, amelyben nem azonosítottunk egyetlen szomatikus mutációt sem a vizsgált génekben. Két gén eltéréseit – a *GNAS*-t, amely a benignus göbök indikátora és a *KRAS*-t, amely csak jóindulatú

pajzsmirigy neopláziát okoz – nem detektáltuk egyik PTC-s mintánkban sem.

#### ***4.1.2. Szövettanilag egészséges szövetekben talált mutációk***

Összesen 52 szomatikus mutációt detektáltunk 15 génben. A legpolimorfabb génnek itt is az *AXIN1* mutatkozott, azonban mutációs mintázata eltért a PTC-s mintákban találtakétól. A leggyakrabban előforduló mutáció az *EIFIAX* c.71G>A volt (2 mintában).

#### **4.2. A genetikai adatok statisztikai elemzése**

A CVA elemzés során az adatokat két szinten elemeztük. Az egyik adatmátrix tartalmazta azon mutációkat/variánsokat, melyek legalább háromszor előfordultak a vizsgált mintákban, míg a másik mátrix a gének szintjén összesítette a mintákban található elváltozásokat.

##### ***4.2.1. Statisztikai elemzés variánsok alapján***

A mutációk közül 16 bizonyult a leginformatívabbnak (e variánsok fordultak elő legalább három mintában), így a végleges CVA elemzés e mutációk szintjén történt. Az elemzés végére a minták mindegyike kapott egy számértéket (F-érték), amely alapján azok tumorkockázata megbecsülhető:

- pozitív F-értékkel rendelkező minták nagy korrelációt mutatnak a tumor meglétével,
- negatív F-értékek a tumormentes állapotot jelzik.

A két pácienscsoport viszonylag jól elkülönül egymástól egy tengely mentén, a CVA analízis során kapott értékek jól korrelálnak a tumor jelenlétével.

A *BRAF* c.1799T>A mutáció rendelkezik a legnagyobb tumorjelző képességgel, hiszen 14 tumoros szövetmintában volt jelen és egyetlen normál, tumormentes mintában sem fordult elő. További 5 olyan variánst különítettünk el, amely szintén nagy szerepet kap a két csoport elkülönítése során (*TSHR* c.1373T>C, *APC* c.636\_637insA, *LPAR4* c.137A>G, *TSHR* c.1963A>G és *SMAD4* c.964T>A). Így a genetikai elemzés, abban az esetben is hasznos lehet, ha csak e 6 pontmutációt elemezzük.

#### **4.2.2. Statisztikai elemzés gének alapján**

Hasonló CVA elemzést végeztünk a vizsgált gének közül azon 20 génen, amelyben legalább egy mutáció is előfordult. Itt is minden mintához hozzárendeltünk egy F-értéket, amely a segítségünkre volt a tumorkockázat becslésében. A gének szintjén vizsgálva a 0,24 F-értéknél lehetett meghúzni a határt a két csoport elkülönítése érdekében, melyek egy tengely mentén viszonylag jól elkülönülnek egymástól:

- 0,24-nél nagyobb F-értékkel rendelkező minták a tumor jelenlétével korrelálnak,
- 0,24-nél kisebb F-érték a tumormentes állapotot tükrözi.

A *BRAF* génben fellelhető mutációk meglepte korrelált legjobban a tumor jelenlétével. Ez után további 6 génben található eltérések azok, amelyek fontosak lehetnek a kockázatbecslésben (*TSHR*, *TP53*, *PIK3CA*, *VHL*, *AKT1* és *APC*). Az első gén, melynek mutációi jóindulatú pajzsmirigyben található, az *EIF1AX*, ezt követi további 4 gén (*RET*, *NRAS*, *DICER1* és *PTEN*).

A páciensek jelenlegi állapota/szöveti minősítése és a statisztikai elemzések alapján történt besorolások a legtöbb esetben jól korreláltak egymással. A legtöbb valóban tumormentes páciens mintáját sikerült az egészséges csoportba, míg a PTC-s minták többségét a tumoros csoportba sorolni.

A mutációk szerinti statisztikai elemzés alapján a szenzitivitás 79%, a specificitás 86%, a PPV 89%, míg az NPV 75%. A gének szerinti statisztikai elemzés alapján a szenzitivitás 87%, a specificitás 68%, a PPV 79%, míg az NPV 79%.

### 4.3. Vékonytű biopsziás minták mutációs profilja

Az analizált 51 FNAB mintából, harmincötben találtunk minimum egy klinikailag releváns genetikai eltérést a megvizsgált 23 gén egyikében, miközben 16 minta esetében egyet sem fedeztünk fel.

Az FNAB mintákban összesen 36 aminosavcserével járó mutációt azonosítottunk, 15 génben: 24 SNV-t (24 missense), 7 INDEL-t (1 inszerció, 6 delécio), 2 splice site variánst, 1 intronikus régióba eső mutációt és 2 MNV-t fedeztünk fel. A talált eltérések közül huszonhetet azonosítottunk új mutációként.

A 8 pozitív, tehát malignus citológiai eredményt kapott mintánk közül 6 esetben találtunk genetikai eltérést.

A citológiai negatív, benignus elváltozást hordozó 28 páciens közül 20 esetben fedeztünk fel genetikai eltérést, mely a későbbi rosszindulatú daganat kialakulását vetítheti előre. Ezen mintákban a COSMIC azonosítóval rendelkező mutációk közül többet azonosítottunk, a legismertebb ezek közül a *HRAS* c.181C>A. A további 8 citológiai negatív esetben nem találtunk elváltozást a vizsgált génekben.

A 14 malignitásra gyanús/bizonytalan kategóriába sorolt páciensek mintái közül 6 esetenél nem fedeztünk fel eltéréseket, míg 8 mintánál detektáltunk mutációt (pl.: *BRAF* c.1799T>A, *NRAS* c.181C>A).

Hat különböző variánsával az *AXIN1* gén mutatkozott a legpolimorfabbnak, míg az *LPAR4* c.137A>G volt a leggyakrabban előforduló mutáció (11 mintában): 6 esetben a citológia negatív, 2 esetben pozitív, további 2 göbnél bizonytalan eredményt adott, míg 1 esetben értékelhetetlen volt a minta (sejtmentes kenet). E gén szerepe még nem tisztázott az irodalomban.

A jól ismert *BRAF* c.1799T>A mutációt 5 biopszia mintában azonosítottuk. A citológiai eredményekkel összevetve 4 mintát helyesen a malignus kategóriába, míg 1 mintát a bizonytalan kategóriába soroltak és későbbi, ismételt mintavételt javasoltak.

Harminc olyan FNAB mintánk volt, amelyben felfedeztünk genetikai eltéréseket, amelyek nem a *BRAF* génben voltak. Ezen mutációk nagyrészt citológiailag negatív, tehát jóindulatú göbökben találtuk meg.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során sikerült egy új, pajzsmirigy specifikus géneket vizsgáló, újgenerációs szekvenáláson alapuló diagnosztikai eljárást kifejlesztenünk, mely az első, legszélesebb körű génpanel Európában. A szekvenálás során kapott eredményeket a szoftveres elemzés után új statisztikai megközelítéssel is analizáltuk, melynek köszönhetően módszerünk képes nagy pozitív prediktív értékkel és szenzitivitással megjósolni egy pajzsmirigygöb malignizálódásának kockázatát.

A korábban megismert, pajzsmirigy tumorgenezisben fontos, *BRAF* driver gén jelentőségét a mi eredményeink is alátámasztották. Azonban a vizsgálatba bevont egyéb gének is – melyekhez korábban talán kisebb jelentőséget társítottak – hasznosnak bizonyultak. A panelünkbe beválogatott génekben számos, eddig nem ismert mutációt azonosítottunk, amelyek hozzájárultak módszerünk diszkriminatív erejének növeléséhez.

A klinikai gyakorlatban napi, rutinszerűen alkalmazott vizsgálati módszerek az esetek többségében megfelelő diagnózist adhatnak. Azonban a bizonytalan kategóriákba eső minták további vizsgálatokat, későbbi mintavételt, végső soron műtéti beavatkozást igényelnek, a mai standard alapján. Amennyiben e vizsgálati módszereket kiegészítenénk molekuláris genetikai diagnosztikai

technikákkal, a citológiai eredményekhez plusz információkat biztosíthatnánk, a bizonytalan kategóriájú esetek számát csökkenthetnénk, sőt a citológiaiilag benignus elváltozások pontos genetikai hátterének megismerésével esetleg megbecsülhetnénk azok malignitási kockázatát.

Diagnosztikai génpanelünket pajzsmirigy biobankunkban tárolt, ismert szövettani hátterű műtéti mintákon optimalizáltuk. E szövettani mintákon végzett vizsgálat során sikerült kialakítanunk egy helyesen alkalmazható NGS-alapokon nyugvó metodikát. Az FNA biopszia mintákon is alkalmazott génpanelünk kellően széleskörűnek bizonyult. Az eredmények alapján jól látszik, hogy a módszer megfelelő kiegészítést nyújt a bizonytalan kategóriájú citológiai eredményt kapott eseteknél, míg a citológiaiilag benignusnak mutatkozott mintáknál plusz információkat nyújthat a betegek számára.



## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 6.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Kocsis-Deák Barbara, dr. Balla Bernadett, dr. Tóbiás Bálint, Árvai Kristóf, dr. Putz Zsuzsanna, dr. Kósa János, dr. Lakatos Péter: *Molekuláris genetikai vizsgálatok a pajzsmirigy daganatainak diagnosztikájában.* Orvostovábbképző szemle, XXV. évf. 9. szám, 2018/09

IF: --

Balla Bernadett, Kocsis-Deák Barbara, Kósa János, Árvai Kristóf, Tóbiás Bálint, Takács István, Lakatos Péter: *Az újgenerációs molekuláris diagnosztikai módszerek lehetőségei az endokrinológiában.* Magyar Tudomány, 2019/05

IF: --

Kocsis-Deák Barbara, dr. Balla Bernadett, Árvai Kristóf, dr. Tóbiás Bálint, dr. Győri Gabriella, dr. Járay Balázs, dr. Székely Eszter, Podani János, dr. Kósa János, dr. Lakatos Péter: *A pajzsmirigyöbök genetikai vizsgálata újgenerációs szekvenáláson alapuló platformon kifejlesztett génpanel segítségével.* Orvosi Hetilap, 2019/36

IF: 0.564

Barbara Kocsis-Deák, Kristóf Árvai, Bernadett Balla, Bálint Tóbiás, Andrea Kohánka, Balázs Járay, János Horányi, János Podani, István Takács, Zsuzsanna Putz, János Kósa, Péter Lakatos: *Targeted mutational profiling and a powerful risk*

*score as additional tools for the diagnosis of papillary thyroid cancer.* Pathology & Oncology Research, 2019 Nov 22. Doi: 10.1007/s12253-019-00772-4.

IF: 2.433

## **6.2 Disszertációtól független publikációk**

Edina Nemes, Katalin Farkas, Barbara Kocsis-Deák, Andrea Drubi, Adrienn Sulák, Kornélia Tripolszki, Piroska Dósa, Ferenc Lakatos, Nikoletta Nagy, Márta Széll: *Phenotypic diversity of patients with LEOPARD syndrome carrying the worldwide recurrent p.Tyr279Cys PTPN11 mutation.* Archives of Dermatological Research, 2015/12

IF: 2.146

Katalin Farkas, Barbara Kocsis-Deák, Laura Cubells Sánchez, Ana Mercedes Victoria Martínez, János Varga, Alfredo Montoro Botella: *The CYLD p.R758X worldwide recurrent nonsense mutation detected in patients with multiple familial trichoepithelioma type 1, Brooke-Spiegler syndrome and familial cylindromatosis represents a mutational hotspot in the gene.* International Journal of Dermatology, 2016/02

IF: 2.666

Katalin Karászi, Szilvia Szabó, Kata Juhász, Péter Király, Barbara Kocsis-Deák, Beáta Hargitai, Tibor Krenács, Petronella Hupuczsi, Offer Erez, Zoltán Papp, Ilona Kovalszky,

Nándor Gábor Than: *Increased placental expression of Placental Protein 5 (PP5) / Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2) in women with preeclampsia and HELLP syndrome: Relevance to impaired trophoblast invasion?* Placenta, 2019/01

IF: 2.733

Bernadett Balla, Sárvári M, János Kósa, Barbara Kocsis-Deák, Bálint Tobiás, Kristóf Árvai, István Takács, János Podani, Liposits Z, Péter Lakatos: *Long-term selective estrogen receptor-beta agonist treatment modulates gene expression in bone and bone marrow of ovariectomized rats.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2019/04

IF: 3.785

Kósa János, Balla Bernadett, Kocsis-Deák Barbara, Árvai Kristóf, Tobiás Bálint, Takács István, Lakatos Péter: *Tumordiagnosztika vérből – A folyadékbiopszia.* Magyar Tudomány, 2019/05

IF: --