

Nem kódoló szöveti RNS-ek vizsgálata jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokban

Doktori tézisek

Dr. Turai Péter István

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Bödör Csaba, DSc, tudományos főmunkatárs

Dr. Bodor Miklós, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szalai Csaba, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Hubina Erika, PhD, főorvos

Dr. Balogh Lídia, PhD, főorvos

Budapest
2022

1. Bevezetés

A mellékvese daganatai közé tartozó úgynevezett incidentalomák prevalenciája, melyek véletlenszerűen, mellékleteként felismert mellékvese daganatok, 4,4%. Túlnyomó többségük (49-69%) jóindulatú mellékvesekéreg adenoma (ACA), melyek sokszor panaszt sem okoznak és nem is igényelnek további orvosi teendőt. A legritkább mellékvese daganat a mellékvesekéreg karcinóma (ACC) incidenciája 0,7-2/millió/év. Habár az ACC nagyon ritka daganat, bármely véletlenszerűen felfedezett mellékvese térfoglalás differenciál diagnózisában szerepel. A mellékvese-daganatok differenciál diagnózisába nemcsak a kérget érintő daganatok tartoznak, hanem a csontvelői elemeket és zsírt tartalmazó myelolipoma és a mellékvesevelő eredetű pheochromocytoma is. A mellékvesék gyakran tartalmaznak távoli malignus daganatokból származó áttéteket is. Mindezen túlmenően a mellékvesekéreg hiperpláziát, a mellékvese cystát, a mellékvese bevézését, ganglioneurinomát és nagyon ritkán a mellékvese lymphomát és a mellékvese tuberkulózist is szem előtt kell tartani, mint lehetséges mellékvese patológiákat. A jó- és

rosszindulatú mellékvese daganatok elkülönítése gyakran nehéz. Az elkülönítő diagnózist segítheti a mellékvese eredetű daganatok hormontermelése: ilyenek például az aldoszteron termelő tumor (Conn-szindróma), kortizol termelő tumor (Cushing-szindróma), illetve az androgéneket termelő tumor. A több hormont is termelő daganatok mindig felvetik a mellékvesekéreg karcinóma gyanúját. A mellékvese-daganatok nagy bizonyossággal való elkülönítése gyakran nem lehetséges és sokszor csak a szövettani vizsgálat ad diagnosztikus értékű információt. Mindazonáltal, nem ritkán még a mellékvesepatológiában jártas szakemberek számára is nagy kihívást jelent a mellékvese-daganatok szövettani elkülönítése.

2. Célkitűzések

Doktori kutatásaim célja kettős volt:

1. Egyrészt, mesterséges intelligencia és laboratóriumi kvantifikáció segítségével a már szakirodalomban leírt mikroRNS-ek olyan új kombinációinak azonosítása, amelyek segíthetik a

jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatok közötti elkülönítést.

2. Másrészt, a cirkuláris RNS-ek kifejeződésének vizsgálata nagy áteresztőképességű újgenerációs szekvenálással jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokból, valamint ép mellékvesekéreg szövetből.

3. Módszerek

3.1. Minták, betegadatok

Összesen 73 formalinnal-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintát vizsgáltam. A mikroRNS kísérletekhez 31 ACC, 32 ACA és 10 normális mellékveseszövetet (normal adrenal cortex, NAC), míg 50 FFPE mintát 18 ACC, 16 ACA és 16 NAC eloszlásban a circRNS méréseim során. A NAC minták teljes veseeltávolításon átesett páciensekből származtak. Minden FFPE mintát mellékvese szakértő patológus ellenőrzött a legfrissebb protokollok szerint.

3.2. Mintafeldolgozás és teljes RNS izolálás szövetből

A szöveti mintákból teljes RNS-t a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific) segítségével izoláltam. Az izolálás a gyári protokollok szerint valósult meg. 1 μ L 0,002 fmol/ μ L koncentrációjú *syn-cel-miR-39-3p*-t alkalmaztam, mint az izolálás minőségének ellenőrzésére szolgáló „spike-in” kontroll a miRCURY LNA RNA Spike-in Kit (Qiagen) protokollja szerint, a nukleinsav izolálás lépése előtt hozzáadva.

3.3. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában

3.3.1. A jó- és rosszindulatú mellékvesetumorokban szignifikánsan eltérő expressziójú mikroRNS-ek szakirodalmi kutatása

Irodalomkutatást a PubMed adatbázisában végeztem a következő keresőszavak használatával: adrenocortical karcinóma; adrenocortical cancer; adrenal cancer; adrenal tumor; and microRNA. Kizárólag eredeti cikkek kerültek beválogatásra. A legtöbb vizsgált mikroRNS

szignifikánsan differenciált expressziót mutatott több tanulmányban is. 16 szignifikánsan differenciált expressziót mutató mikroRNS került beválasztásra.

3.3.2. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel

Az RNS reverz transzkripciója TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) és egyedi TaqMan mikroRNS assay-k segítségével valósult meg. A következő mikroRNS assay-eket használtam: *miR-7*, *miR-9*, *miR-21*, *miR-195*, *miR-205*, *miR-210*, *miR-214*, *miR-335*, *miR-375*, *miR-431*, *miR-483-3p*, *miR-483-5p*, *miR-497*, *miR-503*, *miR-508*, és *miR-511*. Belső kontrollnak az *RNU48*-at, míg külső kontrollnak az extrinsic *cel-miR-39-et* használtam. Kvantitatív valós idejű PCR-vizsgálatot a TaqMan Fast Advanced Master Mix-szel (Thermo Fisher Scientific) hajtottam végre Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR System készüléken.

3.3.3. Biostatistikai elemzés

A statisztikai analízist a 4.1.1 verziójú R for Windows (R Foundation for Statistical Computing) programmal

végeztük. Az ACC vs. ACA csoportbesorolásban kiemelkedő szerepet játszó mikroRNS-ek sorrendje a random forest módszerrel határoztuk meg az „átlagos pontosságcsökkenés” (R csomag randomForest) fontossági mérőszámmal, amelyet a szakirodalomban már leírt összefüggések megerősítésére használtunk. A minták automatikus ACC vagy ACA csoportokba sorolásának lehetőségét gépi tanuláson alapuló módszerekkel teszteltük (R packages nnet and caret). A modellek közül a legalább 90%-os osztályozási képességgel rendelkező kombinációkat választottuk ki a gépi tanuláson alapuló osztályozás validálására.

A validálás során egy független, ACA és ACC mintákat tartalmazó kohorszot használtuk és a 43 ismeretlen mintát külön-külön osztályoztuk. A kombinációk végső becsült csoportbesorolását a leggyakoribb (>50%) értékek kiválasztásával határoztuk meg 10 000 becslésből valamennyi mintán. Az egyes modellek érzékenységet, specificitását, pozitív prediktív értékét és negatív prediktív értékét – a minták jó- vagy rosszindulatú biológiai viselkedésének felfedése után – a modellek becsléseiből

származó és a tényleges szövettani diagnózisból származó adatok összehasonlításával határoztuk meg.

3.4 Cirkuláris RNS profilozás ACC-ben, ACA-ban és NAC-ban

3.4.1. Cirkuláris RNS dúsítás szövetből

Az izolációs lépés után a teljes RNS-t tartalmazó oldat a cirkuláris RNS-eken kívül további lineáris RNS molekulákat is tartalmaz (pl. mRNS, tRNS, mikroRNS). A lineáris RNS-ek emésztéséhez a circRNS vizsgálatok obligát lépéseként RNáz R emésztést hajtottam végre 1 μ l RNase R (Lucigen, Epicentre) enzim segítségével. Az oldatban lévő további nem-cirkuláris RNS-ek depléciójához Poly(A) Tailing Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtam. A poliadenilációs lépés után oligo-dT mágneses gyöngyök szuszpenziója következett. Ezt követően 1 percig a mágneses állványra helyeztem, majd a tiszta circRNS oldatot tartalmazó felülúszót összegyűjtöttem a további lépésekhez.

3.4.2. Szöveti circRNS profilozás újgenerációs szekvenálás segítségével

A cDNS könyvtárat a tisztított cirkuláris RNS oldatokból készítettem el a NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina E7770 (New England Biolabs) segítségével a gyártói utasítások szerint. Az újgenerációs szekvenálást a MiSeq Reagent v3 600 kittel hajtottuk végre Illumina MiSeq készüléken. Az adatok feldolgozásához három különböző cirkuláris RNS detektáló programot teszteltünk: Autocirc, CIRI2 és CircExplorer2-t. Az annotáláshoz és a cirkuláris RNS-ek teljes szekvenciájának feltérképezéséhez a CircRNAprofiler programot használtuk. A differenciált expressziót mutató cirkuláris RNS-ek a limma-trend algoritmus szerint TNM normalizációs módszerrel lettek végrehajtva. A P-érték korrekciót Benjamini-Hochberg FDR módszerrel számítottuk ki.

3.4.3. Szignifikánsan eltérő expressziójú cirkuláris RNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel

TaqMan miRNA divergens primer assay-eket alkalmaztunk (Catalog Number: 230744765) a top 5 szignifikánsan differenciált expressziót mutató cirkuláris RNS (PHC3, FCGBP, TIMMDC1, KDM4C, MAN1A2) RT-qPCR

validációjához. Első lépésben a lineáris RNS-ek 1 μ L RNase R-rel (20 U/ μ l; Lucigen, Epicentre) való szelektív degradációját hajtottam végre. A reverz transzkripcióhoz Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-tet (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztam a gyártó utasításai szerint random primereket alkalmazva (Roche).

3.4.4. Biostatistikai elemzés

Az adatok kiértékeléséhez a Δ Ct módszert használtam Microsoft Excel segítségével. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 7 segítségével végeztem.

3.4.5. A *circPHC3* lehetséges mikroRNS interakcióinak vizsgálata

A clipSearch program segítségével mikroRNS célpontokat kerestünk a PHC3 circRNS szekvencia alapján. A *mature_high_conf_v22_1*.fa mikroRNS szekvenciákat használtuk célpontként. Három lehetséges mikroRNS-t választottunk ki, amelyekről irodalmi adatok alapján már leírták a mellékvesekéreg daganatokkal kapcsolatos relevanciájukat. Kimutatták, hogy a *let-7c*, valamint a

miR-214 és a *miR-195* szignifikánsan alulexpresszált az ACC-kben az ACA-khoz képest.

3.4.6. A kiválasztott potenciális cél mikroRNS-ek validációja RT-qPCR módszerrel

Ugyanazon validációs kohorszt használtuk a mikroRNS expressziós mérésekhez, mint a circRNS validációjához. TaqMan miRNA Reverse Transcription Kitet a hozzá tartozó egyedi TaqMan MiRNA Assay primer mixekkel (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztam az RT reakció végrehajtásához a teljes RNS izolátumon. Kvantifikáltam a *miR-195*, *let-7c-3p*, *miR-214* expresszióját az extrinsic *syn-cel-miR-39* kontroll segítségével. A RT-qPCR méréseket a TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) használatával végeztem Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR készülékkel (Thermo Fisher Scientific) a gyártó utasításai szerint.

4. Eredmények

4.1. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában

4.1.1. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel

4.1.1.1. A legjobban teljesítő mikroRNS panelek összeállítása

A legjobban teljesítő mikroRNS kombinációkat neurális hálózat alapú, 90-10%-os véletlenszerű tanuló-tesztelő keresztvalidáció módszerével választottuk ki. 24, legalább 90% osztályozó képességgel rendelkező statisztikai modellt választottunk ki további validációra. A 24 modell a következő mikroRNS-eket tartalmazta: *miR-9*, *miR-195*, *miR-210*, *miR-375*, *miR-483-3p*, *miR-483-5p*, *miR-497*, *miR-503* és *miR-508*. A *miR-503*, *miR-483_3p*, *miR-195*, *miR-375* és *miR-483_5p* volt a legjobb 5 mikroRNS, amely a leghelyesebben csoportosította a 30 mintát a megfelelő csoportokba a random forest algoritmus segítségével.

4.1.1.2. A mikroRNS panelek validációja

24 modell között 3 mutatott 90% fölötti szenzitivitási és specificitási értékeket. A *miR-195 + miR-210 + miR-503*, a *miR-210 + miR-375 + miR-503* és a *miR-210 + miR-483-5p + miR-503* kombinációk. A kombináción alapuló előrejelzések diagnosztikus teljesítménye egyértelműen felülmúlta az egyedi mikroRNS-ek diagnosztikus teljesítményét.

4.2. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben

4.2.1. Szöveti cirkuláris RNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálással

Összesen 6532 már ismert és *de novo* cirkuláris RNS-t találtunk a három használt kimutatási eszközzel, és ezek közül 445 circRNS-t találtunk konzisztensen mindhárom eszközzel.

4.2.2. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő expressziójú cirkuláris RNS-ek validációja

A hőtérkép alapján az 5 leginkább differenciáltan expresszált cirkuláris RNS-t választottuk ki validációra (PHC3, FCGBP, TIMMDC1, KDM4C, MAN1A2). Ennek az 5 cirkuláris RNS-nek az RNS szekvenálási eredményeinek ellenőrzésére RT-qPCR-t hajtottunk végre különböző, a backsplice junction-t (BSJ) lefedő primerekkel egy teljesen független validációs kohorszban (10 ACC, 8 ACA and 8 NAC). A *circPHC3* (CircAtlas ID: *PHC3_0006*; CircPedia ID: *HSA_CIRCpedia_44334*) szignifikánsan felülexpresszálnak adódott ACC és ACA betegekben a NAC betegekhez képest, ami összhangban volt korábbi szekvenálási eredményeinkkel. A másik 4 cirkuláris RNS esetében nem kaptunk szignifikánsan eltérő eredményt.

4.2.3. A *circPHC3* lehetséges mikroRNS interakcióinak vizsgálata

A *circPHC3* által a potenciálisan kötődő mikroRNS-eket a clipSearch program segítségével határoztuk meg *in silico* módon. Az *in silico* előrejelzés alapján meghatározott differenciáltan expresszálódó *circPHC3*-hoz potenciálisan kötődő mikroRNS-et RT-qPCR módszerrel

határoztuk meg. Három potenciálisan kötődő mikroRNS-t választottunk ki a szakirodalomban is leírt relevanciájuk alapján. *let-7c-3p* és a *miR-214* szignifikánsan alulexpressziót mutatott ACC vs. NAC, míg a *miR-195* szignifikáns alulexpressziót mutatott ACC vs. ACA FFPE minták között.

5. Következtetések

Doktori kutatásaim során célunk volt a mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganatai közti klinikai differenciáldiagnosztikai különbségtétel segítése biomarkerek kutatásával. A következtetéseinket az alábbiakban foglaltuk össze:

1. Kifejlesztettünk új, RT-qPCR módszeren alapuló mikroRNS biomarker kombinációkat, amelyek magas szenzitivitási és specificitási értékekkel képesek elkülöníteni egymástól a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg szöveti mintáit gépi tanuláson és neurális hálón alapuló mesterséges intelligencia módszerek segítségével, amelyek képesek lehetnek segítséget nyújtani a mellékvese daganatok

differenciáldiagnosztikájában. A legjobban teljesítő 3 kombinációs modell: a *miR-195 + miR-210 + miR-503*, a *miR-210 + miR-375 + miR-503* és a *miR-210 + miR-483-5p + miR-503* 90% feletti szenzitivitási és specificitási értékeket mutatott.

a. A három modell differenciáldiagnosztikai képessége egyértelműen felülmúlja a magukat a mikroRNS kombinációkat tartalmazó egyedi mikroRNS-ekkel elért elkülönítő képességet, mind a szakirodalmi eredményekkel, mind a saját méréseink eredményével összehasonlítva.

b. Az eredményeink további, még nagyobb elemszámú kohorszokon való validációja és mellékvese-biopsziában történő potenciális felhasználásának kiértékelése a jövő feladata. Szintén, friss fagyasztott mellékvesekéreg mintákon történő prospektív vizsgálatokkal tovább növelhető eredményeink bizonyossági foka.

2. Elsőként mutattuk ki a mellékvesekéreg-daganatok differenciált cirkuláris RNS expresszióját nagy áteresztőképességű RNS szekvenálással szöveti mintákon. Kimutattuk a *circPHC3* differenciált expresszióját a jó- és

rosszindulatú mellékvesetumorok és normál mellékvesekéreg szövetei között.

a. A *circPHC3* mellékvesében és mellékvese daganataiban betöltött biológiai viselkedésének felderítésére további vizsgálatok szükségesek a jövőben.

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke

1. Turai PI, Herold Z, Nyirő G, Borka K, Micsik T, Tóke J, Szücs N, Tóth M, Patócs A, Igaz P (2022) Tissue miRNA Combinations for the Differential Diagnosis of Adrenocortical Carcinoma and Adenoma Established by Artificial Intelligence. *CANCERS* 14: 4 Paper: 895, 14 p.

Impakt faktor 2021: 6,575

2. Turai PI, Igaz P (2020) A cirkuláris ribonukleinsav és tumorbiológiai jelentősége. *ORVOSI HETILAP* 161: 11 pp. 403-412., 10 p.

Impakt faktor 2020: 0,540

6.2. Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

1. Igaz P, Toth G, Nagy P, Dezső K, Turai PI, Medvecz M, Wikonkal N, Huszty G, Piros L, Toth E, Bozsik A, Likó I, Patócs A, Butz H (2022) Surprising genetic and pathological findings in a patient with giant bilateral periadrenal tumours: PEComas and mutations of PTCH1 in Gorlin-Goltz syndrome. JOURNAL OF MEDICAL GENETICS

Impakt faktor 2021: 5,954

2. Turai PI, Nyíró G, Butz H, Patócs A, Igaz P (2021) MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Pheochromocytoma /Paraganglioma. CANCERS 13: 7 Paper: 1522, 16 p.

Impakt faktor 2021: 6,575

3. Decmann A, Perge P, Turai PI, Patócs A, Igaz P (2020) Non-Coding RNAs in Adrenocortical Cancer: From Pathogenesis to Diagnosis. CANCERS 12: 2 Paper: 461, 17 p.

Impakt faktor 2020: 6,639

4. Tömböl Zs, Turai PI, Decmann A, Igaz P (2020) MicroRNAs and Adrenocortical Tumors: Where do we Stand on Primary Aldosteronism? HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 52: 6 pp. 394-403., 10 p.

Impakt faktor 2020: 2,936

5. Decmann A, Nyirő G, Darvasi O, Turai PI, Bancos I, Pezzani R, Kraljevic I, Kastelan D, Parasiliti-Caprino M, Nirschl N, Daniel Heinrich, Attila Patócs, Peter Igaz (2019) Analysis of circulating microRNAs in primary aldosteronism. ENDOCRINE ABSTRACTS 63 Paper: GP198
6. Decmann A, Nyirő G, Darvasi O, Turai PI, Bancos I, Kaur RJ, Pezzani R, Iacobone M, Kraljevic I, Kastelan D, Parasiliti-Caprino M, Maccario M, Nirschl N, Heinrich D, Reincke M, Patócs A, Igaz P (2019) Circulating miRNA Expression Profiling in Primary Aldosteronism. FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY 10 Paper: 739, 12 p.

Impakt faktor 2019: 3,644

7. Decmann A, Bancos I, Khanna A, Thomas MA, Turai PI; Perge P, Pintér JZs, Tóth M, Patócs A,

Igaz P (2021) Comparison of plasma and urinary microRNA-483-5p for the diagnosis of adrenocortical malignancy. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 297 pp. 49-53., 5 p.

Impakt faktor 2022: 3,595

8. Decmann A, Bancos I, Thomas MA, Turai PI, Perge P, Toth M, Patocs A, Igaz P (2019) Evaluating the applicability of urinary *miR*-483-5p as a non-invasive marker in adrenocortical cancer patients ENDOCRINE ABSTRACTS 63 Paper: P18 (2019)