DOI:10.14753/SE.2018.2136

Új sejtszintű D-vitamin hatások egészséges és kóros szövetekben

Doktori értekezés

Dr. Horváth Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Bittner Nóra, PhD., főorvos
Dr. Reusz György, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerő László, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szalai Csaba, DSc., egyetemi tanár
Dr. Kiss Csaba, PhD., főorvos

Budapest
2017

DOI:10.14753/SE.2018.2136

Tartalom

Rövidítések jegyzéke 4

1. Bevezetés 7

1.1 A D-vitamin szerkezete és szintézise 7

1.2. D-vitamin ellátottság és D-vitamin hiány 9

1.3. 25-hidroxivitamin D_3 1-alpha-hydroxiláz (CYP27B1) 9

1.4. Az 1α,25-dihidroxivitamin D_3-24-hidroxiláz (CYP24A1) 10

1.5. A D-vitamin hatásmechanizmusa 11

1.5.1. D-vitamin receptor (VDR) 12

1.5.2. 1,25-D3-MARRS receptor 12

1.6. A D-vitamin és a WNT (Wingless type) útvonal kapcsolata a csontanyagcserében 12

1.6.1. Általános áttekintés 12

1.6.3. Az LRP5 gén szerepe a csontanyagcserében 15

1.6.4. GPR177 és csontanyagcsere 15

1.6.5. SP7 – egy WNT reguláló transzkripciós faktor? 16

1.7. D-vitamin és carcinogenezis 16

1.7.1. A D-vitamin és tumorgenezis biokémiája 17

1.7.2. D-vitamin és vastagbélrák (CRC) 20

1.7.3. A D-vitamin szerepe a pajzsmirigy daganatok patogenezisében 23

2. Célkitűzések 25

3. Anyagok és módszerek 26

3.1 A 24-hidroxiláz (CYP24A1) és 1-alfa hidroxiláz (CYP27B1) gén, valamit fehérje szintű expressziós vizsgálata differenciált pajzsmirigy tumorokban 26

3.1.2. Vizsgált populáció 26

3.1.3. RNS izolálás és kvantitatív valós idejű PCR 26

3.1.4 Genomi DNS izolálás, szomatikus pontmutációk és génátrendeződések analízise 27

3.1.5. A CYP24A1 fehérje immunhisztokémiai detektálása 28

3.1.6. Statisztikai analízis 29

3.2. D-vitamin kezelés és a 24-hidroxiláz (CYP24A1) gátlásának vizsgálata in vitro humán colon tumor sejtvonalon 30

3.2.1. Használt vegyületek ... 30
3.2.2. Sejtvonal ... 32
3.2.3. Sejtproliferációs esszék ... 33
3.2.4. RNS izolálás és kvantifikálás ... 36
3.2.5. Statisztika ... 37
3.3. A WNT jelátviteli rendszer kapcsolata a D-vitamin és csontanyagcserével ... 37
3.3.1. Vizsgált populáció ... 37
3.3.2. Egypontos nukleotid polimorfizmus (SNP) választás ... 38
Genotipizálás ... 38
3.3.3. Statisztikai vizsgálat ... 38
4. Eredmények ... 39
4.1. A 24-hidroxiláz (CYP24A1) és 1-alfa hidroxiláz (CYP27B1) gén, valamint fehérje szintű expressziós vizsgálata differenciált pajzsmirigy tumorokban ... 39
4.1.1. A vizsgált populáció és a minták leíró statisztikája ... 39
4.1.2. A CYP24A1 és CYP27B1 gének expresszió változása papilláris tumorszövetben a saját ép kontrollhoz képest ... 39
4.1.3. CYP24A1 fehérjeszintű expressziója immunhisztokémiai módszerrel ... 40
4.1.4. A papilláris tumorminták funkcionális és patológiai alcsoportok szerinti felosztása és a CYP24A1 gén kifejeződése ... 41
4.1.5. A CYP24A1 expresszió, valamint a tumorszövet egyéb hisztológiai és genetikai jellemzőinek multiparaméteres főkomponens analízise ... 42
4.2. D-vitamin kezelés és a 24-hidroxiláz (CYP24A1) gátlásának vizsgálata in vitro humán colontumor sejtvonalon ... 43
4.2.1. A CYP24A1 expresszió idő- és koncentrációfüggő változásai 1,25-D3 vitamin kezelést követően CACO-2 sejteken ... 43
4.2.2. Tetralon származékok és a CYP24A1 inhibitor, KD-35 vegyület hatása a CACO-2 sejtvonalra ... 45
4.2.4. A citotoxicitás tesztek eredménye ... 46
4.2.5. A sejtproliferációs esszé eredménye ... 47
4.2.6. Változások a CYP24A1 mRNS expresszióban 1,25 D3-vitamin és KD-35 vegyület hatására a CACO-2 sejtvonalon ... 48
4.3. A WNT jelátviteli rendszer kapcsolata a D-vitamin és csontanyagcserével ... 49
4.3.1. A vizsgált betegek leíró statisztikája ... 49
4.3.2. Genotipizálási eredmények ... 50
4.3.3. Az LRP5 gén polimorfizmusainak hatása a csonttömegre és a törési kockázatra ... 53

DOI:10.14753/SE.2018.2136

4.3.4. Az LRP5 gén haplotípus analízisének eredményei és gén-gén interakciók.. 53
4.3.5. A GPR177 és SP7 gének hatása a csonttömegre, valamint a törési kockázatra 54
4.3.6. A vizsgált polimrizmusok és a keringő D-vitamin szint összefüggése..... 54
5. Megbeszélés 55
5.1. CYP24A1 expresszió és CYP24A1 gátlás tumorokban 55
5.1.1. CYP24A1 expresszió pajzsmirigy daganatokban 55
5.1.2. CYP24A1 gátlás colorectalis carcinoma sejtekben..... 56
5.2. A D-vitamin és a WNT útvonal kapcsolata a csontanyagcserében 58
6. Következtetések..... 61
7. Összefoglalás..... 63
8. Summary..... 64
9. Irodalomjegyzék 65
10. Saját publikációk jegyzéke 78
10.1. A disszertációval összefüggő saját közlemények listája 78
10.2. A disszertációval nem összefüggő saját közlemények listája 78
11. Köszönetnyilvánítás 82

DOI:10.14753/SE.2018.2136

Rövidítések jegyzéke

1,25-D3-MARRS: 1,25-D3-vitamin membrane associated rapid response receptor

15-PGDH: 15-hidroxi-prostaglandin dehidrogenáz

25-OH-D3: 25-hidoroxi D3-vitamin

5'-BrDU: 5'-bromo-deoxyuracil

7-DHC: 7-dehidrokoleszterin

AIPC: Activated in Prostate Cancer protein

ANCOVA: kovariancia analízis

APC: adenomatózis polipózis coli

BMD: bone mineral density, csontsűrűség

BMI: body mass index, testtömegindex

BRAF: b-Rapidly Activated Fibrosarcoma kinase

BSA: bovine serum albumin, borjú szérum albumin

cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát

CDC6: cell division cycle 6 protein

CDH1: kadherin-1 gén

CDK: ciklin dependens kináz

cDNS: copy dezoxiribonukleinsav

CEU: Central european population, közép-európai populáció

COGA1: XVI típusú kollagén alfa-lánc génje

COX2: ciklooxigenáz-2

CRC: vastagbélrák

CYP450: citokróm P450

CST5: cystatin D kódoló gén

DBP: D-vitamin kötő fehérje

DKK1: Dickkopf-1 gén

DKK2: Dickkopf-2 gén

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNS: dezoxiribonukleinsav

DXA: Dual-energy X-ray Abrorption

ELE1: Nuclear Receptor Coactivator 4

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EMAS: European Male Ageing study

ER: ösztrogén receptor

FCS: Fetal Calf Serum, embrionális borjú szérum

FFPE: formalin fixated paraffin embedded, formalin fixált, paraffinba ágyazott

GAPDH: glükóz-aldehid-foszfát dehidrogenáz

gDNS: genomiális DNS

GPR177: G-protein coupled receptor 177

GWAS: Genome-ide Association Study

HIF1: Hypoxia Inducible Factor 1

IL: interleukin

LDH: Laktát-dehidrogenáz

LOH: Loss of heterozgosity, a heterozigótaság elvesztése

LRP5: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5

M-MLV: Moloney Murine Leukaemia Virus

MMP9: Mátrix metalloproteináz-9

MPK5: Mitogén aktivált protein kináz

mRNS: messenger ribonukleinsav

NADH: Nikotinamid-adenin-dinukleotid

NFκB: Nukleáris Faktor κB

NSAID: nem szteroid gyulladáscsökkentő

PCA: főkomponens analízis

PCP: Planar Cell Polarity

PCR: Polimeráz láncreakció

PTC: Papilláris pajzsmirigy carcinoma

PTH: Parathormon

qPCR: quantitatív PCR

RANK: Receptor Activator of Nuclear κB

RNS: ribonukleinsav

RT-PCR: reverz transzkriptáz PCR

RXR: Retinoid X-receptor

SA: szelektív aromatáz modulátor

SD: standard deviáció

SDS: Nátrium-dodecil-szulfát

SFRP: secreted Frizzled-related protein-1

SNP: Egypontos nukleotid polimorfizmus

SRB: Szulforodamin-B

SV: Splicing variant

TCA: Triklóracetát

TCF/LEF: Transcription factor/Lymphoid Enhancer Binding factor

THP: tetrahidroxipiranil

TIMP-1: szöveti metallopeptidáz

TRIS: tris-hidroximetil-amino-metán

UVB: Ultraibolya B sugárzás

VDR: D-vitamin receptor

VDRE: D-vitamin receptor reszponzív elem

VEGF: Vaszkuláris-endotheliális növekedési faktor

WHO: World Health Organization

WNT: Wingless type

ZEB1/2: Zinc-finger E-box binding homeobox

DOI:10.14753/SE.2018.2136

1. Bevezetés

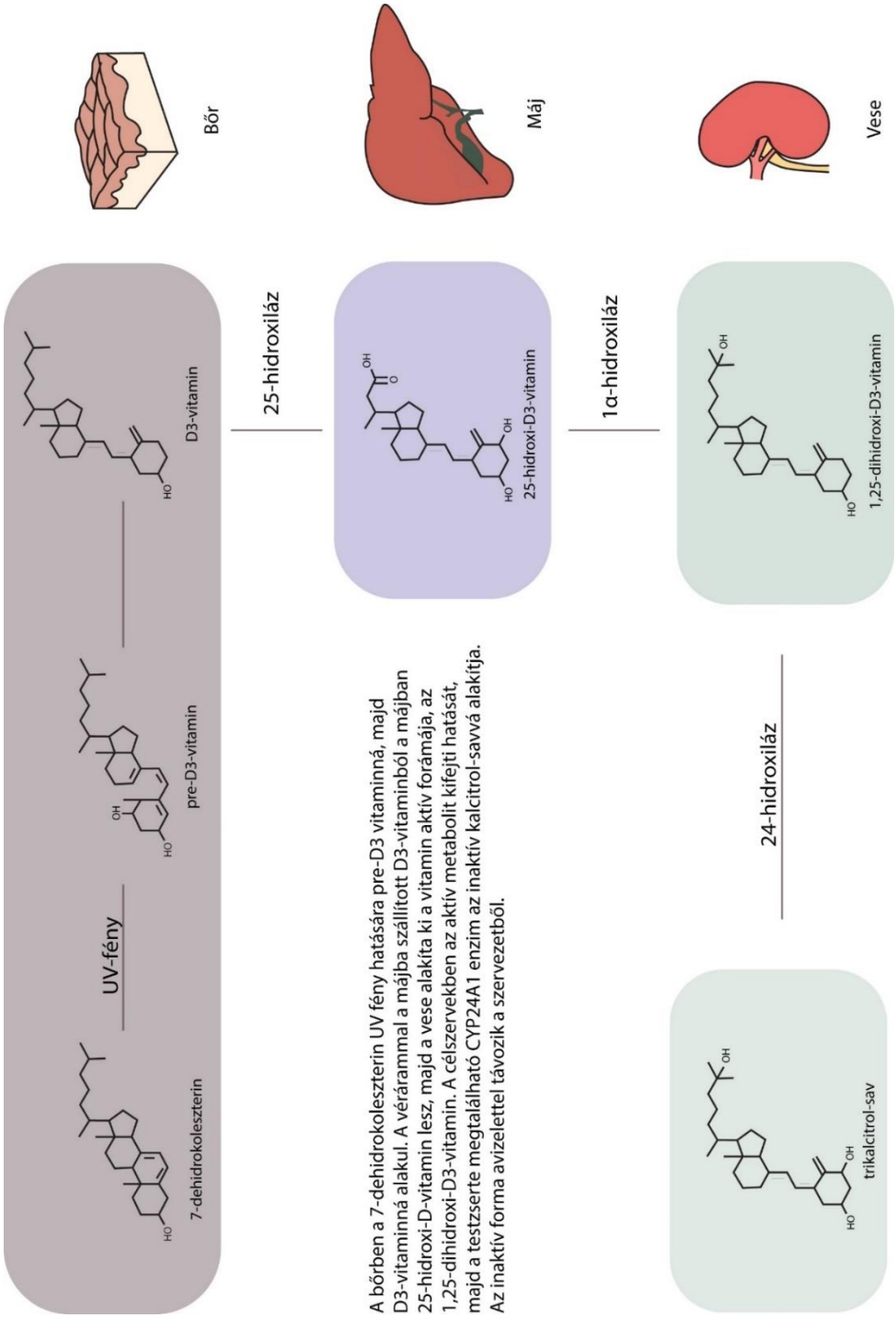
1.1 A D-vitamin szerkezete és szintézise

A D-vitamin felfedezése az általa okozott hiánybetegséghez, a rachitishez, vagy köznapi nevén angol kórhoz köthető. A betegség a 19. században ütötte fel a fejét a szennyezett levegőjű európai városokban. Legfőbb tünetei a csöves csontok deformitása, valamint a növekedési retardáció. (2, 3) Már korán felismerték, hogy a halmájolaj tartalmaz egy rachitis ellenes faktort, valamint azt, hogy UVB besugárzással a betegség gyógyítható. Arra is fény derült, hogy a zsírok rachitis ellenes faktor tartalma emelhető UVB fénnyel. UVB besugárzott bőrt rachitises patkányokkal etetve, a hiánybetegség tünetei megszüntethetőek. 1936-ban sikerült meghatározni a D-vitamin szerkezetét, valamint bizonyítani, hogy a halmájolaj rachitis ellenes faktora és a D-vitamin egy és ugyanaz a vegyület. (4)

A D-vitamin a szteránvázas vegyületek csoportjába, azon belül is a szekoszteroidok közé tartozik. Szintézise során a kiinduló 7-dehidrokoleszterin B-gyűrűje felhasad UVB fény hatására, a felhasadt B-gyűrű miatt soroljuk a vegyületet a szekoszteroidok közé. (5) Többféle D-vitamint különböztethetünk meg. Az elsőként izolált D1-vitaminról később kiderült, hogy valójában egy keverék, lumistirol és ergokalciferol keveréke. A D2-vitamin az ergokalciferol, amely növényi eredetű, az emberi szervezetbe exogén úton kerül be. A D3-vitamin, vagy kolekalciferol, állati eredetű, ennek előállítására az emberi szervezet is képes, valamint állati eredetű tápanyagok fogyasztásával juttathatjuk a szervezetünkbe.

A kolekalciferol egy gyűrűs szerkezetű, lipofil molekula. Mivel a vegyület szintézise az emberi szervezetben is megtörténhet, a vitamin elnevezés nem állja meg a helyét. A vegyületet sokan a hormonok közé sorolják. Előállítása a bőrben 7-dehidrokoleszterinből (7-DHC) történik. UVB fény hatására a 7-DHC pre-D3-vitaminná alakul. Ez a reakció a bőr epidermális rétegében, azon belül is a stratum basalében és a stratum spinosumban történik a legnagyobb mértékben. Ezt követően a pre-D3-vitamin a májban található CYP27A1 enzim hatására 25-hidroxi-kolekalciferollá alakul. (6-9) A vérben keringő 25-hidroxi-

DOI:10.14753/SE.2018.2136



1. ábra: A D-vitamin anyagcsere sematikus áttekintése. Az ábrán látható, hogy a vitamin szintézise a szervezet különböző szöveteiben zajlik. A vitamint inaktiváló CYP24A1 enzim (24-hidroxiláz) szervezet minden szövetében megtalálható.

kolekalciferolból a CYP27B1 enzim készíti el a biológiailag aktív 1,25-dihidroxi-kolekalciferolt. (9-11) Az 1,25-dihidroxi kolekalciferol a VDR-hez (D-vitamin receptor) kötődve fejti ki hatását. A vegyület inaktiválását 1,24,25-trihidroxikolekalciferollá a CYP24A1 enzim végzi. (12-14) Az inaktív forma kalcitriol savvá alakul, ami egy hidrofil vegyület, és a szervezetből a vesén keresztül kiválasztható. (1. ábra)

1.2. D-vitamin ellátottság és D-vitamin hiány

A D-vitamin hiány az egész világon elterjedt jelenség. Mint láthattuk a D-vitamin forrása lehet a táplálkozással bevitt D-vitamin, valamint a szervezet által termelt D-vitamin. A szintézishez elengedhetetlen a napfény, azon belül is a 280-320 nm közötti UVB fény. Azonban a modern társadalmakban az ember egyre több időt tölt a négy fal között, így a napfényen töltött idő gyakran nem elegendő a megfelelő D-vitamin szint fenntartásához. Magyarországon a téli időszakban a D-vitamin hiányos emberek aránya eléri a 70%-ot, és ez a nyári időszakban sem csökken számottevően. A napvédő krémek, a levegőszennyezettség, valamint az ablaküvegek mind kiszűrik a napfény UVB komponensét. A D-vitamin hiányának legismertebb következménye a csontok mineralizációjának csökkenése. A vitamin legfontosabb hatása, hogy serkenti a bélből a Ca^{2+} ionok felszívódását. Amennyiben a vitaminból nincs elegendő a szervezetben, egy másodlagos hyperparathyreoidizmus alakul ki, az emelkedett parathormon (PTH) a csontok Ca^{2+} tartalmát mobilizálja, ezáltal az egészséges csontszerkezet elvesztését idézi elő. A D-vitamin hiány bizonyítottan szerepet játszik számos extraszkeletális betegségben, mint pl. különböző tumorok, kardiovaszkuláris megbetegedések, infekciók gyakoriságában. Indiai felmérések alapján a D-vitamin hiány nagyban hozzájárul az ottani populáció komorbiditásainak prevalenciájában. Ebből következik, hogy a D-vitamin pótlásával számos betegség incidenciája csökkenthető lenne, ehhez azonban az egyes országokban a D-vitamin hiány felmérésére, egységes ajánlásokra, rendszeres szűrésre, valamint a D-vitamin pótlására van szükség.

1.3. 25-hidroxivitamin D_3 1-alpha-hydroxiláz (CYP27B1)

A CYP27B1 enzim felelős a D3-vitamin aktív formájának, az 1α, 25-dihidroxi-kolekalciferolnak a szintéziséért. Az enzim által katalizált reakcióban a pre-D3-vitamint az 1α pozícióban hidroxilálja. Az enzimet kódoló gén a 12-es kromoszóma hosszú karján

található. A humán genomban egyetlen kópia lelhető fel. Ez egy 5 kilobázis hosszúságú, 9 exont tartalmazó gén.(15, 16) Az mRNS által kódolt fehérje 507 aminosavból áll, 55kDa tömegű. (17, 18) Expressziós regulációjában szerepet játszik mind a PTH és a kalcitonin, melyek az enzim expresszióját segítik, mind az aktív D3-vitamin, mely negatív feedback mechanizmussal csökkenti a CYP27B1 expressziót. (19) A kész fehérje a belső mitokondriális membránhoz kötődik. Expressziója elsősorban a vesék tubuláris sejtjeiben figyelhető meg azonban kimutatható mind keratinocitákban, mind humán placentában. (20) Az enzim funkcióvesztő mutációja felelős a rachitis 1a típusáért. Daganatok patogenezisében is kimutatták a szerepét. Csökkent expressziója esetén invazív típusú petefészek daganatok alakulnak ki. (21) LNCaP sejtek in vitro transzfekciója során antiproliferatív hatásokról számoltak be. (22)

1.4. Az 1α,25-dihidroxivitamin D_3-24-hidroxiláz (CYP24A1)

A CYP24A1 enzim a citokróm-P450 (CYP) enzimek családjába tartozik. Ezek az enzimek hem-doménnel rendelkeznek, a sejtek metabolizmusában vesznek részt. Feladatuk a sejtbe kerülő különböző szerves vegyületek oxidációja, a szteroid szintézistől a gyógyszer metabolizmusig nagyon sokrétű feladatokat látnak el. Funkciójukat tekintve monooxidázok, egy O-atomot visznek fel a szubsztrátra, miközben az oxigén molekula másik atomja vízzé redukálódik.

A CYP24A1 enzim egy protoporfirin-IX-hemoprotein, a genomban kódoló régiója a 20-as kromoszóma hosszúkarjának 13-as lókuszán helyezkedik el. A sejtben a mitokondriumban foglal helyet. Működéséhez elengedhetetlen egy N-terminális, 150 aminosavból álló szekvencia, mely a mitokondrium belső membránjához köti az enzimet. Az enzim egy kevert funkciójú oxidoreduktáz, amely egy mini-elektrontranszportlánchoz kötődik. A transzportlánc részei a NADPH-ferredoxin-reduktáz, a ferredoxin, valamint a CYP24A1.(23) Az enzim expressziója együtt jár az aktív D-vitamin metabolit szintjének csökkenésével, így negatív feedback mechanizmusnak fogható fel. (24)

A CYP24A1 a sejtekben alacsony szinten expresszálódik. (Kivétel a vese, ahol a CYP24A1-nek konstitutiv enzim szerepe van) Ez az expresszió azonban gyorsan indukálható fiziológiás körülmények között. Génje a VDR egyik fő célpontja, transzkripciós aktivitása jóval szignifikánsabb emelkedést mutat, mint a többi VDR által mediált géné, több százszorosára emelkedik a kimutatható mRNS a sejtben D-vitamin

kezelést követően. Normális körülmények között a D-vitamin emelkedése és a CYP24A1 expressziója között 1-2 órás latencia idő van. Azonban malignus sejtekben a bazális CYP24A1 is igen magas. Ezt a kiegyensúlyozatlan emelkedést kimutatták a colon, cervix, ovarium, oesophagus és a tüdő rákos elváltozásaiból is. Ez az emelkedés nem a normális transzkripciós reguláció eredménye. Igazolták, hogy vastagbél adenomákban és vastagbél rákokban az emelkedett CYP24A1 szint nem jár emelkedett CYP27B1 és VDR szintekkel, sőt az utóbbi két fehérje inkább csökkenést mutat a malignus elváltozásokban. Amennyiben a CYP24A1 emelkedés a megnövekedett VDR aktivitás következménye lenne, várható lenne a VDR szintjének emelkedése is. Viszont colon carcinomában kimutatható a CYP24A1 kódoló 20q13 lókusz amplifikációja, a 20-as kromoszóma hosszú karjának funkciószerzése pedig összefüggést mutat az adenoma-carcinoma átalakulással, valamint a májmetasztázisok előfordulásával.(24)

A sejtvonalakból és biopsziás anyagokból kimutatott mRNS és a szintetizált CYP24A1 enzim szintje között azonban diszkrepancia van. Ezt az eltérést magyarázhatja az, hogy az mRNS poszttranszkripciós változásokon megy keresztül Az alternatív splicing eredményeképpen különböző mRNS variánsok (splicing variants, SV) jönnek létre. Horváth H és munkatársai vizsgálataik során 3 SV-t mutattak ki. Az SV1 variáns megtartja szubsztrát kötő kapacitását, azonban elveszíti a mitokondriumkötő régióját. Mivel így nem fér hozzá a mitokondriális elektron transzportlánchoz, ezért enzimatikus aktivitását elveszíti. Az SV2-es variáns funkcionálisan hasonló az SV1-hez. Az SV3-as variáns működésbeli eltérése nem ismert, de férfi páciensek biopsziás mintáiból nagyobb mennyiségben mutatható ki, mint nőkből. Feltételezhető további SV-k jelenléte is, a 10-es exon eltávolítása az enzim hemkötő képességét venné el, amely szintén katalitikus diszfunkcióval jár. Az 1-es és 2-es exon splicingja az enzim szubsztrátkötő kapacitásának elvesztésével járna. Az, hogy a különböző SV-k milyen klinikai következményekkel járnak, még nem tisztázott, azonban feltételezhető, hogy a D-vitamin mikrokörnyezet megváltoztatásával a vitamin génregulációs tulajdonságait megváltoztathatják.(23)

1.5. A D-vitamin hatásmechanizmusa

A D-vitamin fejezetben részletezett hatásmechanizmusát sematikusan a 2. ábra tekinti át.

1.5.1. D-vitamin receptor (VDR)

A D-vitamin hatás közvetítésében ennek a receptornak van a legfontosabb szerepe. A VDR egy Zn-ujjas doménnel rendelkező magi receptor fehérje. A ligandját megkötve hatását a sejtmagban a génexpresszió befolyásolásával váltja ki. A VDR a DNS úgynevezett D-vitamin reszponzív elemeihez (VDRE) kötődik. A receptor homodimerek vagy a retinoid-X-receptorral (RXR) kialakított heterodimerek útján tudja hatását kifejteni. A DNS-hez kötött receptorkomplex mellett komodulátor fehérjékre van szükség, melyek lehetnek hiszton modifikátorok, RNS transzkriptáz aktiválást végző fehérjék vagy kromatin modulátorok. A bekötődött komplex összetételétől függően tudja serkenteni vagy gátolni a génátírást.

A VDR receptor a D-vitamin metabolizmus elemeinek átíródását is szabályozza. A CYP24A1 fehérje expresszióját emelve gátolja a túlzott D-vitamin szintemelkedést és a következményes hypercalcaemiát.

1.5.2. 1,25-D3-MARRS receptor

A magi receptorokon kifejtett lassú, génexpresszió változást okozó hatásokon kívül a D-vitaminnak ismertek gyorsan kialakuló hatásai is. A vékonybélben az emelkedett D_3-vitamin szint Ca2+ és foszfát gyors felszívódását okozza. Ennek a hátterében a sejtfelszíni 1,25-D3-MARRS (Membrane Associated Rapid Response Steroid Receptor) receptor áll. Ez a fehérje hatását cAMP emelkedés révén váltja ki. Elképzelhető, hogy számos sejtproliferációval kapcsolatos hatás hátterében ez a receptor áll. Emlődaganat sejtekben kimutatták, hogy a receptor inaktiválása a D3-vitamin antiproliferációs hatását megnyújtja. A jövőben ez a receptor akár új támadáspontot is nyithat az eddig megismert D3-vitaminhoz kötődő jelátviteli útvonalakon.

1.6. A D-vitamin és a WNT (Wingless type) útvonal kapcsolata a csontanyagcserében

1.6.1. Általános áttekintés

A D-vitamin és a WNT útvonal közötti legfontosabb kapocs a Dickkopf-fehérje (DKK). A DKK2 fehérje expressziója D-vitamin jelenléte mellett jelentős emelkedést mutat mind

normoxia, mind hypoxia esetén, azonban a differenciálódó osteoblastokban a DKK2 expresszió csökkenése következik be emelt D-vitamin koncentráció mellett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a két útvonal között bonyolult, illetve még nem teljesen tisztázott kölcsönhatások vannak, feltételezhető, hogy a WNT útvonal szerepe a korai osteoblast differenciációban játszik szerepet, míg a D-vitamin a késői differencializálódásban, valamint a megfelelő szervetlen mátrix kialakításában fontos.

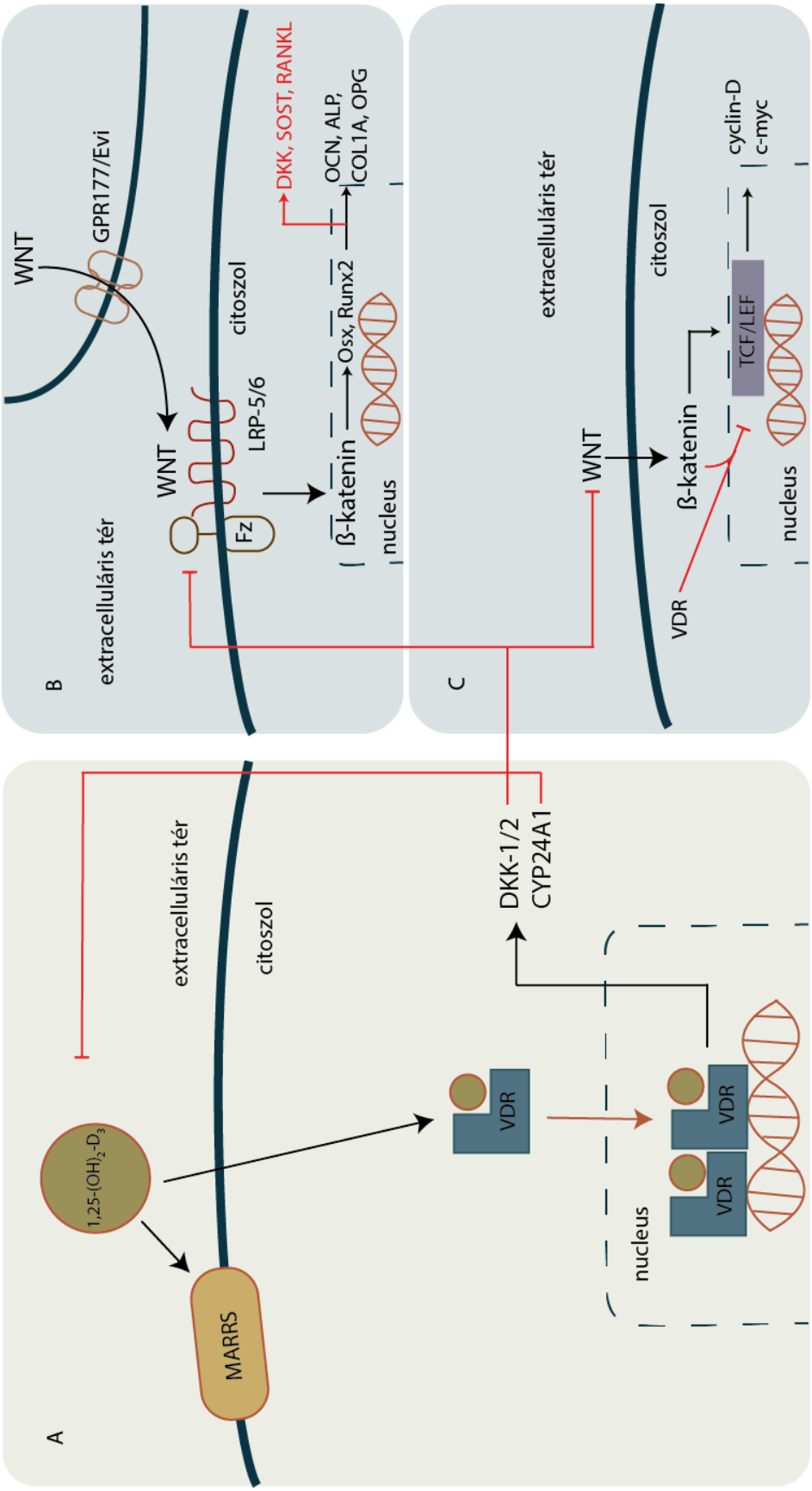
A csontanyagcsere és a WNT jelátviteli útvonal kapcsolata az oszteológia sokat kutatott területe. A WNT rendszer egy olyan kiterjedt jelátviteli útvonal, ami kulcsszerepet játszik az embriogenezis során. Az útvonal központi elemét a szolubilis WNT-fehérjék képezik, melyek receptorukhoz lekötődve sejtfolyamatok igen széles palettáját képesek elindítani. Alapvetően két formájuk van, az úgynevezett kanonikus és nem kanonikus útvonalak.

A kanonikus útvonal a sejtek génexpressziós mintázatát változtatja meg. A WNT fehérjék a lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) receptor és a Frizzled (Fz) receptor által alkotott komplexhez kötődve kiváltják a β-katenin felszaporodását a sejtmagban, így beindítják a TCF/LEF (Transcription factor/Lymphoid Enhancer Binding factor) transzkripciós faktor család működését. WNT fehérjék hiányában a β-katenint lebontja egy számos fehérjéből álló destrukciós komplex.

A nem kanonikus útvonalaknak két tagját különböztetjük meg, a PCP (Planar Cell Polarity) és a kalcium útvonalat. Ezek az útvonalak nem az LRP5/6 receptoron keresztül fejtik ki a hatásukat. A PCP útvonal a sejtek polaritásáért felelős, míg a kalcium útvonal az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} exkrécióját szabályozza.

A csontanyagcsere és a WNT útvonal kapcsolatára az LRP5/6 fehérje hívta fel a figyelmet, a receptor mutációját csontbetegségekkel hozták összefüggésbe.

DOI:10.14753/SE.2018.2136



2. ábra: A D-vitamin hatásmechanizmusának sematikus áttekintése. A D-vitamin hatását a membránhoz kötött MARSS receptor, vagy a magi VDR receptor útján fejti ki (A). A (B) jelölésű ábrán a D-vitamin csontanyagcserében, a (C) jelű ábrán a sejtosztódásban betöltött szerepe látható.

1.6.3. Az LRP5 gén szerepe a csontanyagcserében

Az LRP5 gén a 11-es kromoszóma hosszú karján, a 11q13.4 pozícióban helyezkedik el. A gén közelítőleg 137 kilobázis hosszú, és 23 exont tartalmaz. Az általa kódolt fehérje egy membránreceptor. Ennek a receptornak kulcsszerepe van a kanonikus WNT útvonal aktiválódásában.

A csontanyagcserében való szerepére egy ritka genetikai megbetegedés, az osteoporosis-pseudoglioma szindróma világított rá. Ez a betegség egy alacsony csontdenzítással, valamint kompressziós törésekkel, és vaksággal járó állapot. Ezidáig az LRP5 génen kívül nem hoztak összefüggésbe más géneket a betegséggel. A szindróma kialakulásához az LRP5-öt érintő biallélikus funkcióvesztő mutáció szükséges. A betegség hátterében álló mutációt heterozigótaként hordozó egyének esetében is megfigyelhető csökkent csonttömeg, valamint azt is leírták, hogy a gén gyakori polimorfizmusai is összefüggésbe hozhatók egészséges egyének denzítás értékeivel, így osteoporosisra való hajlammal is. Bizonyos vizsgálatok kapcsolatot véltek felfedezni a polimorfizmusok és a csípőtáji törések között, de az ezzel kapcsolatos eredmények mind a mai napig ellentmondásosak.

Azt azonban elmondhatjuk, hogy számos GWAS (Genome Wide Association Study) vizsgálatnak sikerült kimutatnia összefüggést az LRP5 gén polimorfizmusai és a vizsgált egyének csonttömege között. Fontos kihangsúlyozni, hogy a GWAS vizsgálatok által kimutatott összefüggéseket nem lehet definitívnek tekinteni, amíg egy független vizsgálat azokat meg nem erősíti.

1.6.4. GPR177 és csontanyagcsere

A GPR177 (G Protein-Coupled Receptor) gén az 1-es kromoszómán található, 135 kilobázis nagyságú, 18 exonos gén. Az általa kódolt fehérje a G-protein kapcsolt membránreceptorok családjába tartozik. Az, hogy receptor funkciót is betölt-e, még további vizsgálatok tárgya. A szerkezeti vizsgálatok ellentmondanak abban, hogy 4, 7 vagy 8 transzmembrán hurokkal rendelkezik-e.

Szerepe a szintetizált WNT fehérjék exkréciója a Golgi-készülékből az extracelluláris térbe. Szerepét a csontanyagcserében több vizsgálat is feltételezi: a GPR177 funkcióvesztése a tengelyirányú fejlődés zavarát okozza. A megfigyelt elváltozások a Wnt3 fehérje hiányához hasonlóak. Heterozigóta GPR177 knock-out (KO) egerekben súlyos csontrendszeri defektusok figyelhetők meg, a totál KO egerek in utero elhalnak. Feldúsulását a Wnt fehérjét expresszáló sejtekben figyelték meg, az ellene termelt antitestekkel kimutatható, hogy mely szövetek termelnek Wnt fehérjéket. Átíródását a β-katenin serkenti, így egyfajta pozitív feedback mechanizmus figyelhető meg.

Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a gén nagyon fontos szerepet játszik a WNT útvonal működésében. Legújabb GWAS vizsgálatok feltételezik szerepét az emberi csonttömeg kialakulásában is.

1.6.5. SP7 – egy WNT reguláló transzkripciós faktor?

Az SP7 vagy másik nevén osterix fehérje egy cink-ujjas doménnel rendelkező transzkripciós faktor, melynek legfontosabb tulajdonsága, hogy a mezodermális sejteket a porc sejtvonal helyett a csont sejtvonal irányába differenciálja. SP7 knock-out egerek ép porcokkal rendelkeznek, ám teljesen hiányzik belőlük a csont.

Az SP7 a HIF-1α-val (Hypoxia inducible factor 1α) együttesen képes gátolni a WNT fehérjék expresszióját, ezen kívül serkenti a DKK-1 expressziót is, mely szintén a WNT útvonal ellen hat. Osteoporoticus személyek keringő mesenchymalis őssejtjeiben csökkent SP7 expresszió mutatható ki egészséges egyénekhez viszonyítva. A Sister Study során kimutatták, hogy az SP7 gén polimorfizmusai összefüggést mutatnak afro-amerikai nők csonttömegével.

1.7. D-vitamin és carcinogenezis

A D-vitamin daganatellenes szerepét számos vizsgálatban sikerült bizonyítani. A vitamin szintje fordított arányosságban áll számos daganattípus előfordulási gyakoriságával. A daganatos megbetegedések száma az egyenlítőtől a sarkkörök felé növekszik, tehát a napfényes órák csökkenésével emelkedik. Ez a megfigyelés is mutatja, hogy valamilyen összefüggés van a fény expozíció és a daganatok között, ezt pedig a D-vitamin mediálja.

1.7.1. A D-vitamin és tumorgenezis biokémiája

A szervezet D-vitamin státuszának meghatározására a 25-hidroxi D_3 szint mérését használjuk. Ezt 32 ng/ml alatt tartjuk szuboptimálisnak, ami a tumor prognózisa szempontjából nem megfelelő. Vashi és munkatársai egy retrospektív tanulmányban kimutatták, hogy az általuk vizsgált 2198 beteg átlagos 25-(OH)-D_3 szintje 25,1 ng/ml volt, ami alatta van az optimális szintnek. Későbbi vizsgálataik során megpróbálták a D-vitamin szintet emelni orális D-vitamin pótlással. A legjobb választ prosztata- és tüdőrák esetén érték el, a betegek 70, illetve 69,2 százaléka reagált orális D-vitamin kezelésre, míg colorectalis és pancreas carcinoma esetén érték el a legrosszabb eredményt (46,7 százalék mindkét esetben).(25)

De milyen mechanizmus figyelhető meg a tumorok részéről? A D-vitamin általános antiproliferatív hatásában részt vevő mechanizmusokat korábban áttekintettük. Az egyes tumor típusok azonban különböző speciális folyamatokat indítanak el, amelyek a betegség prognózisára jó, vagy rossz hatással is lehetnek.

Prosztatarákos betegekben megfigyelhető a DBP (D-vitamin kötő fehérje) fehérje antiproliferatív hatása. Ez a fehérje a D-vitamin szállítását végzi a vérben. Szelektív deglikozilációjával egy DBP-maf (DBP-macrophag aktiváló faktor) fehérje keletkezik. Ennek a fehérjének számos antiproliferatív hatása van. Egyrészt serkenti a tumor sejtek antigén expresszióját, ezzel gátolja a metasztázis képződést, és elősegíti a tumoros klónok elpusztítását. Leírták a fehérje osztódás gátló hatását, valamint az uPAR (urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor) termelés gátlását, ami megszünteti a tumoros sejtmasszában az angiogenezist, aminek hatására megáll a tumor növekedése is.(26)

A prosztatarák a jó prognózisú daganatok közé tartozik. Kezelése során az androgének megvonására törekszünk. A rákos sejtek ezek után inszenzibilissé válnak az androgénekre, ami egy nehezen kezelhető, mai tudásunkkal nem befolyásolható andorgén független prosztata carcinoma (AIPC) kialakulását vonja maga után. Jelenleg arra törekszik az orvostudomány, hogy az AIPC kialakulását késleltesse, mivel az hamarosan metasztázisokhoz, majd halálhoz vezet.(27)

A prosztata rák kialakulásában fontos szerepet játszik a gyulladás. Gyulladásos folyamatok vezetnek a prosztata proliferatív gyulladásos atrófiájához. Ezt követően a benignus és a malignus szövetek jegyeit is magán viselő, prosztata intraepitheliális

neopláziás (PIN) szigetek alakulnak ki. Ezekben a szigetekben emelkedett COX-2 aktivitás, és gyulladásos jelek mutathatók ki.(28)

A prosztata rák esetén kialakuló tumor ellenes hatás kialakulásában fontos szerepet játszik a D-vitamin. Antimitotikus-proapoptotikus szerepe mellett jótékony hatása van a gyulladásos folyamatokra is. A prosztata sejtjeiben a D-vitamin a következő antiinflammatorikus hatásokkal rendelkezik: csökkenti a COX-2 szintjét, ezáltal a keletkező prosztaglandinokat, emeli a prosztaglandin inaktiváló 15-hidroxiprosztaglandin dehidrogenáz szintjét (15-PGDH), valamint csökkenti a prosztaglandin receptorok szintjét is. Összességében a tumoros területeken kialakuló mikrokörnyezetben a prosztaglandinok aktív metabolitjai, és az általuk mediált proinflammatorikus citokinek száma csökken.(27) Ezek az antiinflammatorikus hatások a vastagbélrák esetén is kimutathatók. A 15-PGDH-t tartalmazó vektorral transzfektált egerekben a tumorok növekedési üteme csökken, a tumor formáció gátlás alá kerül.(29) Prosztatarákban szintén kimutatták az NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) gyulladás csökkentő jelátviteli útvonal aktiválódását is.

Prosztata tumoros esetekben a D-vitaminnal egyidejűleg adott NSAID kezelés javítja a prognózist. Metasztázisokban a COX-2 gátlás gátolja a növekedést. Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a D-vitamin gyulladáscsökkentő hatása mellet lassítja a sejtosztódást így hozzájárul a tumor ellenes effektusok kialakulásához.(30)

A D-vitamin által szintén serkentett mitogén aktivált protein kináz foszfatáz 5 (MPK5) szintén csökkenti az inflammatorikus citokinek szintjét. (31)

Ezeken a hatásokon kívül megfigyelhető ebben az esetben is a p21/27 expresszió fokozódása, ami p53 dependensen gátolja a G_0-G_1 átmenetet.(32, 33)

A D-vitamin az angiogenezist is gátolja prosztata rákos esetekben. Hypoxia hatására a hypoxia indukálta faktor-1 (HIF-1) emeli a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) szintjét, ami endothel toborzáshoz, és angiogenezishez vezet. A D-vitamin ezt a mechanizmust két ponton is gátolja. Egyrészt csökkenti a VEGF szintjét, valamint in vitro vizsgálatokban teljesen, in vivo vizsgálatok alapján részlegesen meggátolja az endothel cső kialakítását, és a tumor vérellátást.(34, 35)

Szintén csökken a mátrix-metalloproteináz 9 (MMP-9), valamint emelkedik a szöveti metallopeptidáz inhibitor-1 (TIMP-1) szintje D-vitamin hatásra, ami az áttétképzés, és az invazivítás csökkenését vonja maga után.(36)

Az emlőrák Európában a nők rákos halálozási okai között vezető szerepet tölt be. 2008-ban az Európai Unióban 332800 haláleset hátterében mutatható ki emlő carcinoma, amivel a vastagbélrákot megelőzve első helyen végzett.(37)

Normál emlő szövetben az epitheliális sejtek proliferációját az ösztrogén indukálja. Az ösztrogén receptor pozitív emlőrákos esetekben (ER+) sincs ez másképp. Az ER+ emlőrákok az összes emlőrák 70 %-át teszik ki. Az egyre szélesedő terápiás spektrum ellenére az emlőrák incidenciája növekvőben van. Ennek a tendenciának a megfordítására jelenthet megoldást olyan kemopreventív ágensek és étrendi kiegészítők bevezetése, amely az emlőrák megelőzését elősegíti.(38)

Kimutatható, hogy azokon a területeken, ahol a napsütötte órák száma magasabb, az emlőrák incidenciája alacsonyabb. Ezen felül kimutatták azt is, hogy a keringő 25-OH D-vitamin szintje a mellrák incidenciájával fordított arányosságot mutat.(39)

Mellrák esetén is kimutathatók azok a mechanizmusok, amelyeket prosztata, illetve vastagbél carcinoma esetén kimutattak, mint a sejtciklus szabályozása, adhezív fenotípus kialakítása, az antiinflammatorikus hatások.

Ami újdonság mellrákos esetekben az előzőkhez képest, az a D-vitamin reguláló szerepe az ösztrogén szintézisében. A D-vitamin a sejt génexpressziójának befolyásolásával csökkenti az emlőrákos sejtek, valamint az őket körülvevő zsírszövet ösztrogén szintézisét, az emlő szöveteinek aromatáz aktivitását, valamint az ösztrogén receptor α (ERα) expresszióját.

Az aromatáz enzim (CYP19A1) a CYP450 szupercsalád tagja. Az enzim legnagyobb mennyiségben az ovariumban expresszálódik, itt készül a szervezet számára a keringő ösztrogén túlnyomó többsége. Ezen felül még néhány szövettípus képes az enzim indukciójára, többek között az emlő is. Posztmenopauzás állapotban, amikor az ovarium ösztrogén szintézise lecsökken, az emlő szövete az ER+ emlőrák számára kulcsfontosságú ösztrogén szintézisének legfőbb helyszíne, így posztmenopauzában az ER+ emlőrák legfőbb növekedési szignálja itt kerül szintézisre. A D-vitamin a genomban elhelyezkedő VDRE-hez kötődve képes elnyomni az aromatáz szintézisét. Ezt a hatást mind az ER+, mind az ER- emlőrákos esetekben kimutatták.(40)

Amennyiben a D-vitamin kezelést szelektív aromatáz inhibitorral egészítjük ki, a tumor növekedése jócskán lelassul a csak aromatáz inhibitorral végzett kezeléshez képest. Ez arra utal, hogy a D-vitamin az úgynevezett szelektív aromatáz modulátorok (SAM)

családjába tartozik. Ezek a vegyületek szövet specifikusan képesek módosítani az aromatáz aktivitást, szignifikánsan csökkentve azt az emlőrákos sejtekben, illetve az őket körülvevő zsírszövetben. Ezzel a tulajdonságukkal nagy mozgásteret engednek a mellrák kezelésében, hiszen nem gátolják az aromatáz aktivitást a szervezetnek azon helyein, ahol ez a hatás nem kívánatos (pl. csontszövet).(41)

További fontos tulajdonsága a vitaminnak az ERα expressziójának csökkentése. Ez a mechanizmus a transzkripció direkt gátlásán alapszik. Így az ösztrogén szinte összes, a tumor szempontjából kedvező hatását csökkenteni tudja. Abban az esetben, ha a D-vitamin kezelést ERα antagonistákkal folytatjuk, a hatás sokszorozódik. (42, 43)

Ezen ismeretek tükrében elmondhatjuk, hogy a D-vitamin potens inhibitora a prosztata, illetve emlő carcinoma növekedésének. Hatásait mind a tumor növekedésén, vérellátásán, migrációs készségén, valamint a gyulladásos faktorok befolyásolása révén éri el.

1.7.2. D-vitamin és vastagbélrák (CRC)

A CRC kialakulásában és prognózisában több biokémiai folyamat vesz részt: ezek közül a legfontosabbnak a SNAIL transzkripciós faktor, az E-kadherin transzkripció, a VDR transzkripció, valamint a D-vitamin szintézisben szereplő enzimek transzkripciós módosulásai tűnnek.

SNAIL és CRC

A SNAIL fehérje egy Zn-ujjas doménnel rendelkező transzkripciós faktor, ami fiziológiásan a velőcső sejtjeinek dúclécbe vándorlását segíti elő. A fehérje aktiválódása tumoros sejtekben az adherens forma elvesztését, a sejtek migrációs aktivitását, valamint a metasztázis képződést segíti elő. A SNAIL a VDR promoter régiójához kötődve csökkenti a VDR expressziót, valamint direkt csökkenti a citoszolban a VDR mRNS féléletidejét. Állatkísérletekben kimutatták, hogy amennyiben egereket emelkedett SNAIL transzkripciós aktivitású SW480-AD (CRC eredetű sejtvonal) sejttenyészetből előállított sejtekkel transzfektáljuk, azok nem reagálnak seocalcitol (nem hypercalcaemizáló D-vitamin analóg) terápiára, ellentétben a bazális SNAIL aktivitású SW480-AD sejtekkel transzfektált egerekkel. Mindezek mellett a SNAIL/VDR arány

kritikus az E-kadherin átírás aktivitása szempontjából. Minél inkább a SNAIL irányába tolódik el az arány, annál alacsonyabb az E-kadherin expresszió. Ebből következik, hogy a magasabb SNAIL aktivitású vastagbélrákban szenvedő betegek kevésbé, vagy egyáltalán nem reagálnak D-vitamin terápiára.(44, 45)

E-kadherin és CRC

AZ E-kadherin az epithelialis sejt-sejt közötti adhezív kapcsolatok kialakításáért felelős. Amennyiben szintje lecsökken, a sejtek fibroblastoid morfológiát vesznek fel, invazív és migrációs tulajdonságaik kerülnek előtérbe, ami rossz klinikai prognózist jelent. Az E-kadherint a genomban a CDH1 gén kódolja. A szint csökkenésében szerepet játszhat a heterozigótaság elvesztése (Loss Of Heterozigosity, LOH), a CDH1 gén promoter régiójának hipermetilációja, valamint a kódoló gén mutációja. A CDH1 gén promoter régiójában a SNAIL kötő domén egy 5'-CACCTG-3' szekvenciájú régió. Kimutatták, hogy ugyanezért a régióért kompetíció áll fenn a SNAIL és a ZEB1/2 homológ Zn-ujjas fehérjék között. Külön-külön mind a SNAIL, mind a ZEB1/2 csökkenti az E-kadherin átírást, azonban a két fehérje egyidejű jelenléte esetén a SNAIL sejten belüli szintjének emelkedése sem okoz E-kadherin hiányt. Ennek hátterében az állhat, hogy a ZEB1/2 SNAIL és egyéb kofaktorok jelenlétében elveszíti a deregulációs aktivitását, és kompetitíven gátolja a SNAIL aktivitását.(46) Mint korábban láthattuk, a VDR ezzel szemben emeli az E-kadherin átírást. További megfigyelés, hogy ha a D-vitamin szint magasabb tartományban helyezkedik el, akkor Ca^{2+} szubsztitúcióval megelőzhető az adenoma kiújulása. Ez alapján elmondható, hogy a ZEB1/2-VDR-SNAIL arány meghatározza az E-kadherin expressziós karakterisztikáját, ezzel a tumor migrációs kézségét, és invazivitását. Ez a D-vitamin terápia szempontjából bizonyos páciens szelekcióra ad lehetőséget.(45, 46)

Wnt-β-katenin útvonal és CRC

A Wnt-β-katenin útvonal az E-kadherin útvonal antagonistája. Ismereteink szerint ezen útvonal aktivációja, vagy az útvonal inhibitorainak megváltozása (DKK-1, SFRP, WIF)

a CRC kialakulásának kezdeti lépései közé tartozik. Olyan gének tartoznak ide, mint az APC, AXIN, CTNNB1/β-katenin.(47)

Normál mucosában a β-katenin az E-kadherinhez kötve a sejtkapcsolatokban tölt be szerepet. A β-katenin tirozin-foszforilációja az E-kadherin- β-katenin komplex felbomlását vonja maga után. A citoszolban a β-katenin az APC-hez kötődik, ami gátolja a fehérje sejtmagba történő lokalizációját, ezzel megakadályozva a β-katenin útvonal aktiválódását. A β-katenint a citoszolban a 26S proteaszóma bontja. Amennyiben az APC fehérje mutációja következik be, ez a hatás elvész. A β-katenin a magba lokalizálódik, ahol kötődve a TCF-hez a sejtosztódás serkentését idézi elő, aktiválva a ciklin D-t, valamint a c-myc transzkripciós faktort. A VDR és a β-katenin fehérje kölcsönhatása stabilizálja a β-katenint, megakadályozza a magi lokalizációt, valamint a tumorgenezisben szereplő gének transzkripciós aktivitás fokozódását.(48)

Egerekben a β-katenin útvonal aktiválódása a következő hatásokat váltja ki:

1. Emelkedett ciklin D1 expresszió, ami a sejtosztódás fokozódásához vezet
2. Emelkedett Stat-3 szint, ami szintén a fokozott osztódási készség jele. A Stat-3 képes a c-myc és a ciklin D1 serkentésére. Ez a mechanizmus valószínűleg a tumor kialakulásában játszik szerepet.
3. A vimentin-1 szintjének emelkedése, ami az epitheliális-mesenchymális átalakulás jele. A mesenchymalis fenotípus a fokozott inváziós és migrációs potenciált vonja maga után, ami a metasztázis képzésben fontos faktor.

A D-vitamin és analógjai ezen felül csökkentik a β-katenin útvonal következő termékeit: ciklin D1, c-myc illetve COX-2. Ezen felül kimutatható, hogy a p21/27 CDK inhibitorok szintje D-vitamin hatására megemelkedik, így további tumor ellenes hatásokkal számolhatunk. A megnövekedett tumor méret a p21 és p27 szintjének csökkenésével jár együtt.(48)

D-vitamin anyagcserét meghatározó enzimek expressziója és CRC

Az aktív D_3-vitamin helyi szintjét a szöveti szinten megtalálható szintetizáló-lebontó enzimek aránya is meghatározza. Igaz, hogy a D-vitamin szintézis legfőbb helyszíne a

vese, de a szervezet több szövete is képes a D-vitamin metabolizmus enzimeit helyi szinten előállítani.(49) Nincs ez másképp a vastagbélhám esetén sem. A vastagbélben kimutatható mind a 25-hidroxivitamin D_3 1-α-hidroxiláz (CYP27B1), mind az 1α,25-dihidroxivitamin D_3-24-hidroxiláz (CYP24A1) is. A CYP27B1 a D-vitamin szintjét emeli, a CYP24A1 azt csökkenti, ezzel a VDR számára meghatározzák a szubsztrát kínálatot, amivel közvetetten befolyásolják a receptor aktivitást. A korai CRC elváltozásban kimutatható a CYP27B1 szint emelkedése. Ez a tumor részéről egy korai, endogén antiproliferatív mechanizmusnak tekinthető. (50) Azonban különböző sejtvonalakon végzett vizsgálatokat áttekintve megfigyelhető, hogy ez a hatás a későbbiekben elveszik.

A CACO-2 humán sejtvonal egy vastagbél eredetű, epitheloid adenocarcinoma sejtvonal. A sejtvonalat 2 klónra oszthatjuk. Ezek egyike a CACO-2/15, mely a korai tumoros elváltozás jellemzőit viseli magán, a másik klón a CACO-2/AQ, amely a késői tumorokra jellemző karakterrel bír. Kállay E. és munkatársai ezt a két klónt, valamint a COGA1 sejtvonalat (tulajdonságait tekintve a késői elváltozásra hasonlít) vizsgálva a következő eredményre jutott: a CACO-2/15 sejtvonalon a D-vitamin szint emelése a CYP27B1, valamint a VDR szint emelkedését okozza. Azonban a késői típusú CACO-2/AQ klón és COGA1 sejtvonal a D-vitamin emelésre nem változtatja meg a CYP27B1 és VDR expressziót, ezzel ellentétben emelik a CYP24A1 szintet, ezzel eliminálva a D-vitamint a sejtekből.(50) Ebből arra következtethetünk, hogy in vivo a CRC-s sejtek elveszítik endogén antiproliferatív mechanizmusukat, és a CYP24A1 emelésen keresztül, mely a VDR aktivitás csökkenését vonja maga után, kivédik a D-vitamin antiproliferatív hatását. Ezzel a cyclin D_1 felszabadul a D-vitamin általi gátlás alól, és elősegíti a tumor sejt G1-S átmenetét.(24, 51)

1.7.3. A D-vitamin szerepe a pajzsmirigy daganatok patogenezisében

A papilláris pajzsmirigyrák a leggyakoribb pajzsmirigy daganat típus, az összes pajzsmirigy daganat körülbelül 85%-át adja. Gyakoribb az előfordulása nőkben. Lassan növő daganat, ritkán ad távoli áttétet, azonban nem ritka a regionális nyirokcsomók érintettsége. Sebészi rezekcióval illetve jód izotóp kezeléssel nagyon jó eredmények érhetők el. A D-vitamin szerepe a pajzsmirigyrák patogenezisében még nem teljesen

tisztázott. Sharma és mtsai. kimutatták, hogy a magas bazális CYP24A1 expresszió alacsony D-vitamin stimulációval és a növekedés inhibíció hiányával jár pajzsmirigy sejtvonalakban. A leginkább érzékeny sejtkultúra a papilláris pajzsmirigy daganat sejtvonal (TPC1) volt. A TPC1 sejtvonalban a D-vitamin kezelés nagy CYP24A1 mRNS expressziós választ vált ki. (52) Laney és mtsai azt találták, hogy a pajzsmirigy nodulusokkal, remisszióban lévő vagy aktív pajzsmirigy daganattal rendelkező betegek esetében a D-vitamin szintje nem tér el lényegesen (53), azonban az egészséges alanyok és a pajzsmirigy daganatokban szenvedők (papilláris, follicularis, anaplasticus) között szignifikáns eltérés van a D-vitamin szintjében. (54) Ismert az is, hogy a differenciált pajzsmirigy rákokban a D-vitamin metabolizmus kulcsszereplői magasabb szinten expresszálódnak. (55)

A papilláris daganatok gyakran hordoznak szomatikus BRAF vagy RAS mutációkat és RET átrendeződéseket. (56-58) A BRAF gén genetikai változásai a leggyakoribb eltérések a PTC-kben, és ezek a daganatok agresszívabb viselkedést is mutatnak, többek között pajzsmirigyen kívüli szövetinváziót, nyirokcsomó áttéteket, valamint rezisztenciát a radioaktív jódkezelésre, és gyakoribb relapszust. (59-61) Korábban kimutatták, hogy a CYP24A1 mRNS jelentősen emelkedett papilláris pajzsmirigy daganatokban a normál pajzsmirigy szövethez képest.

2. Célkitűzések

Jelen dolgozat elkészítésekor elsődleges célunk a D-vitamin mediált szöveti mechanizmusok mélyebb megismerése volt. Vizsgálataink során elsősorban a daganatos megbetegedésekre – tekintettel azok emelkedő incidenciájára és magas halálozására - valamint a csontanyagcsere betegségekre – hisz a posztmenopauzás nők döntő többségét érintik - koncentráltunk.

A következő kérdésekre kerestünk választ:

- Valóban képes-e a D-vitamin tumor sejtek növekedésének gátlására?
- Képesek-e a tumoros sejtek kivédeni a D-vitamin által közvetített antiproliferációs hatást?
- Tudjuk-e a daganatos sejtek védekezését szelektíven gátolni úgy, hogy az ép szövetek ne szenvedjenek kárt?
- Megfigyelhetők-e a fenti mechanizmusok in vivo körülmények között, humán eredetű szövettani mintákban?
- Milyen a CYP24A1 enzim ill. a CYP27B1 enzim expressziója papilláris pajzsmirigy tumor szövetben?
- Összefügg-e a CYP24A1 expresszió demográfiai, hisztológiai és klinikai paraméterekkel?
- Milyen a magas CYP24A1 expressziót mutató daganatok eloszlása a PTC minták funkcionális alcsoportjai között?
- Megfigyelhető-e összefüggés a D-vitamin és a WNT útvonal között a csontanyagcserében?
- A csontanyagcserében már leírt WNT útvonalakat érintő polimorfizmusok és a keringő D-vitamin szint között találunk-e összefüggést?

3. Anyagok és módszerek

3.1 A 24-hidroxiláz (CYP24A1) és 1-alfa hidroxiláz (CYP27B1) gén, valamit fehérje szintű expressziós vizsgálata differenciált pajzsmirigy tumorokban

3.1.2. Vizsgált populáció

A génexpressziós vizsgálatokat 100 magyar, kaukázusi, nem rokon betegen végeztük. Minden betegtől gyűjtöttünk papilláris tumor mintát, valamint szövetmintát az ép pajzsmirigy területről a SE I. sz. Sebészeti Klinikájával és az Országos Onkológiai Intézettel együttműködve. A betegektől részletes anamnézist vettünk fel, melyben külön kitértünk a pajzsmirigy funkciókra, egyéb pajzsmirigy betegség előfordulására, pajzsmirigy hormon szintekre és a hormonpótlásra. Minden esetben a sebészileg eltávolított mintát részletes szövettani vizsgálatnak vetettük alá a SE. II. sz. Patológiai Intézetének segítségével. Csak azokat a mintákat vizsgáltuk, amelyek esetén papilláris carcinomát állapítottak meg. Az átlagos tumorátmérő 17,25 mm volt. A mintákban meghatároztuk a szomatikus mutáció státuszt, vizsgáltuk a BRAF 600-as kodont, a HRAS 61-es kodont, a KRAS 12, 13-as kodont, az NRAS 61-es kodont, az ELE1/RET, a CCDC6/RET átrendeződéseket. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága elfogadta (SOTE-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU), minden beteg írásos beleegyezést adott.

3.1.3. RNS izolálás és kvantitatív valós idejű PCR

A vizsgálatokat 31 friss műtéti és 69 formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintából végeztük el. Az intraoperatív pajzsmirigy mintákat (kb. 250 mg) a feldolgozásig -72 °C-on tároltuk. A fagyasztott szövetmintákat Fisher Scientific PowerGen 125 szövethomogenizátorral homogenizáltuk. Minden mintapárból teljes RNS-t izoláltunk (a tumorszövetből és a környező ép szövetből is) Roche High Pure Total RNS izoláló kittel (Roche, Indianapolis, IN, USA) a gyártó protokollja szerint. Az FFPE mintákból a Roche High Pure RNA Paraffin kittel (Roche, Indianapolis, IN, USA) vontuk ki az RNS-t. Az izolált RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük

(Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, USA) 260/280 nm-en. 200U SuperScriptIII RNáz H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével 500 ng RNS-t fordítottunk cDNS-sé, primerként 125 ng random hexamer primert (Promega, Madison, WI, USA) használtunk 40 U RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor jelenlétében 30 ul térfogatban.

A kiválasztott gének expressziós különbségét validált, gyári Taqman próba alapú kvantitatív valós idejű RT-PCR segítségével határoztuk meg (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Minden szett tartalmaz egy forward, valamint egy reverz primert és egy fluoreszcens próbát (ID CYP24A1: Hs00167999_m1, ID CYP27B1: Hs00168017_m1). A próbák exonok találkozását fedik le, így nem detektálják az esetleges genomi DNS szennyeződést. A PCR reakció térfogata 20 ul volt, amelybe 2 ul cDNS-t, 10 ul Taqman 2x Universal PCR No AmpErase UNG MasterMix-et (Applied Biosystems), 1 ul 20x Taqman Gene Expression Assay-t (Applied Biosystems) és 7 ul ultrapurified MilliQ vizet mértünk. A minták sokszorosítására és a fluoreszcencia detektálására ABI Prism 7500 RealTime PCR rendszert használtunk. Minden mintát 3 párhuzamos méréssel határoztunk meg. 96-os PCR plate-eket használtunk a következő protokollal: 10 perc denaturálás 95 °C-on, valamint 50 ciklus 15 s-os denaturálás 95 °C-on és 1 min annelálás és amplifikálás 60 °C-on. Endogén kontrollként a GAPDH housekeeping gént választottuk (ID: Hs99999905_m1). Relatív kvantifikálási vizsgálatunkat a 7500 System SDS szoftver 1.3-as verziójával végeztük. Az mRNS-ek relatív mennyiségét az átlagolt dCt értékekből számoltuk, cut-off értékként a két nagyságrendbeli mRNS expresszió változást választottuk a tumoros és a saját kontroll szövet között.

3.1.4 Genomi DNS izolálás, szomatikus pontmutációk és génátrendeződések analízise

A genomi DNS-t a Roche High Pure PCR template preparation kit segítségével izoláltuk. Az izolált DNS mennyiségét Qubit dsDNA HS Assay Kit-tel mértük.

A genetikai eltérések azonosításához a Nikiforov és mtsai által leírt protokoll egy módosított verzióját használtuk. A genomi DNS-ben BRAF (rs113488022), NRAS (rs79057879), HRAS (rs28933406), KRAS (rs121913535) pontmutációkat azonosítottunk valós idejű PCR segítségével (Roche LightCycler 2.0 Instrument, Roche

Instrument Center AG, Rotkreuz, Svájc). Az amplifikálást 20-50 ng genomi DNS-ből végeztük. Ehhez 40-40 pmol primert (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany), 2-2 pmol hibridizációs próbát (TIB MOLBIOL), 1,5 ul ultratisztított vizet, 0,5 ul marha szérum albumint (BSA) és 5 ul JumpStartTaq ReadyMix PCR polimerázt adtunk. A reakciós elegyet 60 ciklus alatt amplifikáltuk, minden ciklus 5 s denaturálás 95 °C-on, anneláláss 54 °C-on 20 s-ig, és lánchosszabbítás 72 °C-on 12 s-ig. Az amplifikálás utáni fluoreszcencia olvadási görbét a hőmérséklet 0,1 °C/s-os emelésével vettük fel, a hőmérséklet tartomány 45 és 95 °C között volt. Az olvadási görbéket a fluoreszcens jel deriváltjaként ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében (-dF/dT). A mutációk detektálásához a mintákban el kellett érni, hogy a sejtek min. 10%-a hordozz a vizsgált genetikai eltérést.

Az ELE1/RET és a CDC6/RET génátrendeződéseket valós idejű RT-PCR technikával azonosítottuk. A szükséges próbákat úgy terveztük, hogy az mRNS-ek fúziós pontjait ismerjék fel. A PCR reakció térfogata 20 ul volt, amelyben 2 ul cDNS, 10 ul Taqman 2x Universal PCR MasterMix No AmpErase UNG (Applied Biosystems), 40 pmol primer set (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany), 2 pmol koncentrációjú 20x hibridizációs Taqman próbák (Applied Biosystems) és 7,5 ul ultra-purified MilliQ víz volt. A minták sokszorosítására és a fluoreszcencia detektálására ABI Prism 7500 RealTime PCR rendszert használtunk. Minden mintát 2 paralell méréssel határoztunk meg 96 lyukú PCR plate-eken. A PCR protokoll a következő volt: 2 perc 50 °C-os inkubálás, 10 perc denaturálás 95 °C-on, valamint 60 ciklus 15 s-os denaturálás 95 °C-on és 1 min anneláláss és amplifikálás 60 °C-on.

3.1.5. A CYP24A1 fehérje immunhisztokémiai detektálása

A fehérje immunhisztokémiai azonosítása formalin fixált, paraffinba ágyazott metszeteken történt, nyúl eredetű, tisztított, antihumán CYP24A1 ellenes antitestekkel (Prestige Antibodies, Sigma-Aldrich). A 2 um vastagságú paraffin metszeteket deparaffináltuk, az endogén peroxidáz aktivitást 1,5%-os, alkoholos H2O2 oldattal inaktiváltuk. A mintákat hőkezeltük 10 mmol/L-es TRIS pufferben az antigén visszanyerhetőség növelése érdekében. A hőkezeléshez egy zárt háztartási főzőautomatát használtunk (Avair IDA). Miután a metszeteket protein blokkoltuk TRIS pufferolt sóoldatban 5%-os alacsony zsírtartalmú tejpor jelenlétében, inkubáltuk őket

szobahőmérsékleten az elsődleges antitesttel 70 percig. A detektálást Novolink polimer kittel hajtottuk végre, a magfestéshez Mayer-féle hematoxilint használtunk. Az immunhisztokémiai festést egy 4 csatornás Freedom Evo automata pipetta rendszerrel végeztük. (TECAN, Mannerdorf, Svájc)

3.1.6. Statisztikai analízis

A CYP24A1 és a CYP27B1 expressziót 100 humán papilláris pajzsmirigy carcinomában (PTC) hasonlítottuk össze a betegekből származó saját kontroll szövettel. Az expressziós értékek nem követték a normál eloszlást, így a nem paraméteres Mann-Whitney U tesztet használtuk. Azokat az eredményeket tekintettük szignifikánsnak, ahol a p-érték kevesebb volt, mint 0,05.

Azokban az esetekben, ahol folyamatos változókat hasonlítottunk össze, a Pearson-korreláció számítást választottuk. Esetünkben ez a CYP24A1 expresszió és a betegek életkora volt.

A PTC mintákat 4 különböző csoportba soroltuk a további analízisekhez. A besorolást a következő kritériumok szerint végeztük:

1. Szomatikus onkogén mutációk (NRAS, KRAS, HRAS, BRAF) és/vagy génátrendeződések (ELE1/RET, CCDC6/RET) jelenléte, illetve hiánya.
2. Konvencionális PTC vagy más hisztológiai típusú PTC (follikuláris, Hürthle-sejtes, magas sejtes, enkapszulált variáns és mikrocarcinómák).
3. A tumor mellett egyéb pajzsmirigy betegség jelenléte (Hashimoto-thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis), illetve hiánya.
4. Nyirokcsomó metasztázis és/vagy vaszkuláris invázió jelenléte, illetve hiánya.

A tumorok CYP24A1 expresszióját a különböző csoportokban Khí-négyzet teszttel hasonlítottuk össze.

Az egyváltozós Mann-Whitney U teszt nem képes az adatokban megbúvó minden információ kinyerésére, így többváltozós adatelemzési módszereket hívtunk segítségül. Főkomponens analízist használtunk arra, hogy ezeket az információkat is elemezni tudjuk. Minden komponenst úgy határoztuk meg, hogy a varianciája a teljes varianciából a lehető legnagyobb legyen. Az egyes vektorokból megfigyelési koordinátákat

számoltuk, hogy megjeleníthetőek legyenek a komponens térben. Grafikus megjelenítéskor a változókat az irányukba mutató vonalak teszik hangsúlyossá. A nyilak hossza és iránya informatív a változók korrelációival és relatív fontosságával kapcsolatban. A grafikus megjelenítés abban is segítségünkre van, hogy kiválasszuk azokat a változókat, amelyek a legnagyobb összefüggéseket mutatják az adatokban megbúvó trendekkel és különbségekkel. Az adatok elemzéséhez a SYNTAX 2000 program csomagot használtuk.

3.2. D-vitamin kezelés és a 24-hidroxiláz (CYP24A1) gátlásának vizsgálata in vitro humán colon tumor sejtvonalon

3.2.1. Használt vegyületek

A CYP24 enzim a CYP450 szupercsalád tagja. Ezen enzimek közös tulajdonsága az aktív helyen található hem domén, melynek katalitikus funkciója szempontjából fontos a porfirin vázban elhelyezkedő Fe atom.(62)

Az enzim blokkolóknak két típusát különböztethetjük meg. Az egyik csoport az úgynevezett azol típusú inhibitor család. Ezek a vegyületek a CYP450 enzimek hem vasához kötődnek heterociklusos nitrogéntartalmú gyűrűjük segítségével. Ez egy igen potens inhibitor hatást eredményez, de nem ad lehetőséget jelentős szelektivításra. Mivel a D-vitamin szintézis két másik kulcsenzime, a CYP27A1, illetve a CYP27B1 is a CYP450 szupercsalád tagja, ezért a D-vitamin sejtosztódást potencírozó hatásának felerősítésére ez a vegyületcsoport nem a legjobb választás.(62)

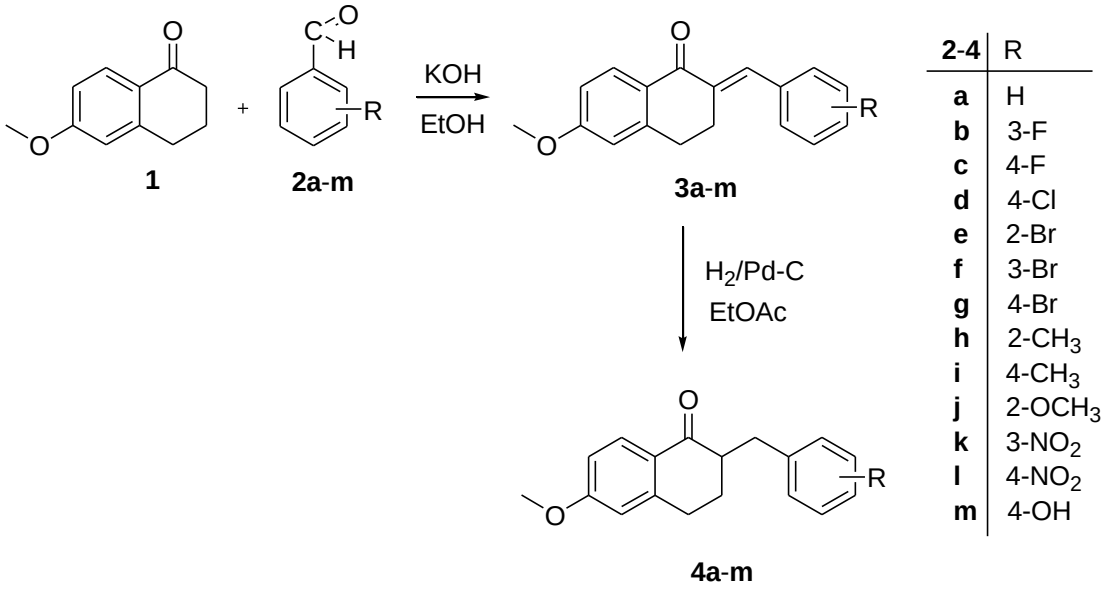
Az úgynevezett nem azol típusú inhibitorok hatásukat az enzim aktív helyén H-kötések és hidrofób kölcsönhatások kialakításával érik el. Mivel ez egy képlékenyebb mechanizmus, ezért ezekkel a vegyületekkel jelentős szelektivítást érhetünk el, azonban a gátló hatás kisebb, mint az azol típusú inhibitoroknál.(62)

Az általunk vizsgált vegyületek a nem azol típusú inhibitorok közé tartoznak, mivel a szelektivítás kulcskérdése a sikerességnek. A vegyületek nagyobb része tetralonvázas szerkezettel bír, míg kisebb részük a szteránvázas vegyületek közé tartozik.

A tetralon vegyületek előállítása során használt metodika a 6-metoxi-1-tetralon vegyületek szubsztituált benzaldehidekkel történő kondenzációját foglalta magában. (63-

65) A kereskedelmi forgalomban kapható 6-metoxi-1-tetralont a 4%-os etanolos KOH oldatban oldott benzaldehidekhez adtuk. A reakciós elegyet szobahőmérsékleten kevertük 1-8 órán keresztül. A kiindulási anyagok elfogyása után az oldatot egy éjszakán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A képződő csapadékot vízzel többször átmostuk. A képződött reziduumot kromatográfiás eljárással tisztítottuk, majd etanolban újra kristályosítottuk. A hidroxil-tetralon származék szintéziséhez a 4-hydroxylbenzaldehid védelmére volt szükség, melyet tetrahydropyranyl (THP) csoport szubsztituálásával értünk el. THP csoport disszociálását etil-acetát, etil-metil-keton és klórossav elegyében történő hevítéssel értük el. A következő lépésben a képződött 2-(szubsztrát)-benzilidén-6-metoxitetralon (3a-m) vegyületeket etil-acetátban oldottuk, majd palládium-szén (Pd/C) katalizátorral hidrogenizáltuk szobahőmérsékleten, 1 atmoszféra nyomással 1 órán keresztül. A palládiumot szilikongél szűrővel távolítottuk el, az oldószert in vacuo vontuk ki. Kromatográfiás tisztítás után a 2-szubsztrát-benzyl-6-metoxi-1-tetralon származékot nyertük vissza. (4a-m) (ld. 3. ábra).

A kísérletek során általunk használt vegyületek szintézisét korábbi CYP-450 enzim inhibitorok alapján a Szegedi Tudományegyetem Szerves Vegytani Intézete végezte. Ezek a vegyületek szterán-, illetve tetralonvázas vegyületek különböző halogénezett származékai. A vegyületeket 10^{-3} mol/l-es koncentrációban, dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldva tároltuk 4 °C-on. Közvetlenül a kísérletek előtt az oldatok további hígításra kerültek steril tápoldatban (GIBCO’S OPTI-MEM) a kísérletben megkívánt töménységre.



3. ábra: A CYP24A1 enzim inhibíciós kísérletben használt vegyületek szintézisét a fenti ábrán tekinthetjük át. A tetralon származékokat a megfelelően szubsztituált benzaldehidekkel reagáltattuk. A hidroxil származékok szintéziséhez a 4-hydroxybenzaldehid hidroxil csoportjának THP védelmére volt szükség. A THP csoport eltávolítását a Pd/C katalizátor jelenlétében végeztük, szobahőmérsékleten, 1 atm nyomás alatt. A kapott reakció termékeket kromatográfiás eljárással tisztítottuk.

3.2.2. Sejtvonal

Kísérletek során CACO-2 humán sejtvonalat használtunk, mely az ATCC-től (American Type Cultutre Collection, Manassas Virginia, USA) került megrendelésre. Ez egy vastagbélrák eredetű adherens, epithelialis sejtvonal. A sejtkultúrát Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) táptalajon tenyésztettük, 10 %-os FCS (Fetal Calf Serum), valamint 1 %-os antibiotikum-antimikotikum (penicillin, streptomycin) oldat jelenlétében (Sigma, St. Louis, MO, USA). Az inkubátorban 37 °C-os, párásított közeget hoztunk létre, 5%-os CO2, valamint 95%-os O2 gázkeverék mellett. A sejteket 90 %-os konfluencia elérése után passzáltuk. A sejteket 96-os plate-eken tenyésztettük, 24 órával a kísérletek összeállítása előtt a D-MEM táptalajt GIBCO'S OPTI-MEM táptalajra cseréltük.

3.2.3. Sejtproliferációs esszék

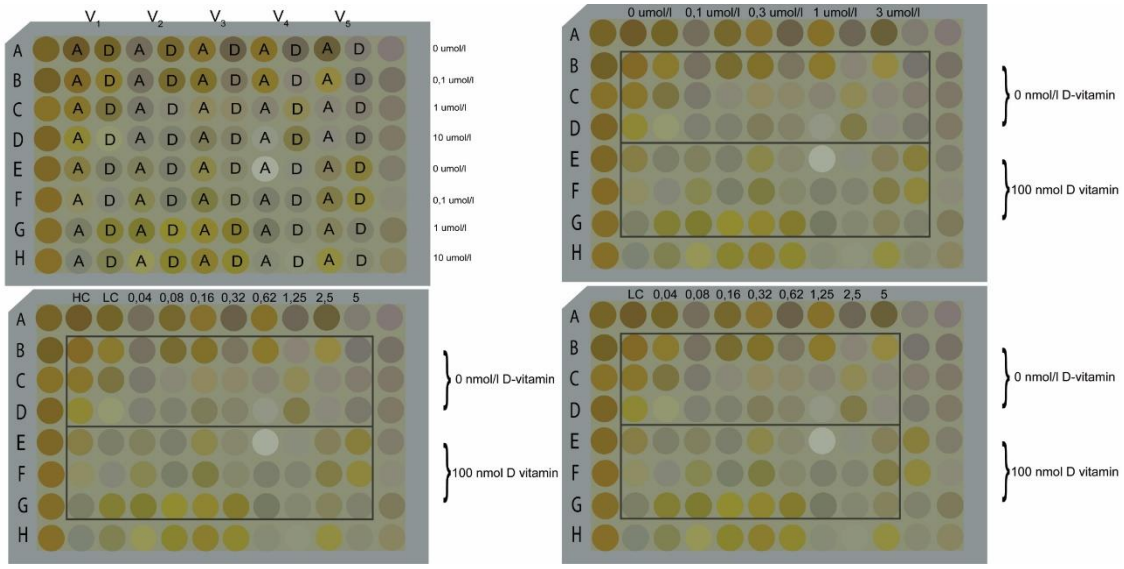
A szűrővizsgálatok menete

A kezdeti kísérletek célja az volt, hogy a rendelkezésre álló vegyületek közül izoláljuk azokat, amelyek önmagukban nem toxikusak a CACO-2 sejtvonalra, azonban D-vitamin jelenlétében a tumoros sejtek számának csökkenését okozzák. Ennek a megoldására SRB toxicitás mérést használtunk. A használt Sulforhodamine-B (SRB) a sejtekben található fehérjékhez kötődik. Mosást követően a lekötött SRB visszaoldásával optikodenzitometriás eljárás során mérhető az egyes wellekben a fehérje tartalom, így következtethetünk arra, hogy az adott wellben mennyi életképes sejt volt. Az ábrán láthatóak a plate-elrendezések. A szűrővizsgálatok során egy plate-n öt különböző vegyületet vizsgáltunk, melyeket három koncentrációban és két párhuzamosban vittünk fel etanol (kontroll, a D-vitamin oldószere) illetve D-vitamin jelenlétében. A következő eredményeket figyeltük meg:

1. A vegyület mind etanol, mind D-vitamin mellett sejtszám csökkenést okozott.
2. A vegyület sem D-vitamin, sem etanol mellett nem okozott sejtszámcsökkenést
3. A vegyület etanol mellett nem, D-vitamin mellett azonban okozott sejtszám csökkenést.

Az első két esetben a vegyületet kizártuk a további vizsgálatokból. A harmadik esetbe tartozó vegyületeknél harmadoló hígítási sort vettünk fel (0-3 umol/l között), és hat párhuzamossal végeztük el az SRB toxicitás vizsgálatot D-vitamin (100 nmol/l), illetve etanol jelenlétében. Ezen vegyületek közül a leghatékonyabbat kiválasztva LDH toxicitás tesztet, illetve 5-BrDU (5-bromo-deoxy-uracil) in korporációs tesztet végeztünk.. Célunk a pontos hatásmechanizmus (citotoxikus vagy antiproliferatív) tisztázása volt. A vizsgálatok során használt plate elrendezéseket a 4. ábra tekinti át.

DOI:10.14753/SE.2018.2136



4. ábra: A szűrővizsgálatok során használt plate elrendezések. A pilot study során 3 párhuzamosban vittük fel a vegyületeket D-vitamin jelenlétében, illetve a D-vitamin oldószereként használt etanollal. A vegyületeket 0; 0,1; 1; 10 umol/l koncentrációban vittük fel. Azokat a vegyületeket választottuk ki, melyek önmagukban nem voltak toxikusak, D-vitamin jelenlétében azonban sejtszámcsökkenést váltottak ki. (SRB toxicitás mérés) (bal felső ábra)
Az így kiválasztott vegyületeket 0-3 umol/l közötti koncentrációban, 6 párhuzamossal vittük fel, D-vitamin ill. etanol jelenlétében. Ebben a vizsgálatban azt láttuk, hogy a KD-35 jelű vegyület koncentráció függően csökkenti a CACO-2 sejtvonal életképességét. (jobb felső ábra)
A KD-35 jelű vegyülettel citotoxicitási illetve antiproliferációs esszéket végeztünk el. Ezek elrendezése a bal alsó (LDH citotoxicitás teszt), illetve a jobb alsó (5-BrDU antiproliferációs teszt) ábrán látható.

SRB toxicitás mérés

A kezdeti vizsgálatok célja az volt, hogy a rendelkezésre álló vegyületek halmazából kiválasszuk azokat, amelyek a sejtszám csökkenését érik el D-vitamin jelenlétében, de nem csökkentik azt D-vitamin hiányában. Ehhez ideális eljárásnak bizonyult a proteinfestésen alapuló Sulforhodamine- B (SRB) vizsgálat, amely egyszerre olcsó és megbízható. A teszt elve az, hogy az SRB festékkel megfestjük a wellek fehérje tartalmát, majd ezt visszaoldva optikodenzitometriás módszerrel szemikvantitatívan következtethetünk a wellben lévő fehérje mennyiségre, mely arányos az életképes sejtek számával. A megkívánt inkubációs idő letelte után a sejttenyésztő edényekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a sejteket fixáltuk 10^{-4} mol/l-es triklórecetsav (TCA) 30 perces alkalmazásával. A fixálás után ötszöri öblítés következett desztillált vízzel, hogy

eltávolítsuk a TCA reziduumot a plate-ről. Ezt követően 30 percig inkubáltuk a sejteket 0,4%-os SRB ecetsavas oldatával. Ezután a felesleges festékanyagot négyszeres 1%-os ecetsavas mosással távolítottuk el. A plate-eket szobahőmérsékleten szárítottuk. A megkötött festékmolekulákat Trisma-Sol-ban oldottuk vissza, majd a plate-et 520 nm-es hullámhosszon mértük ELISA leolvasó segítségével. (ThermoFisher Luminoskan Ascent, Waltham, MA, USA)

Így szemikvantitatívan megállapítható volt, hogy a használt vegyület koncentráció függően csökkenti-e a sejtszámot D-vitamin (100 nmol/l) jelenlétében.

LDH citotoxicitás teszt

A vegyületek citotoxicitásának mérését a sejtfelülúszóban mérhető LDH (laktát-dehidrogenáz) aktivitás meghatározásával vittük véghez. Az LDH egy stabil citoplazmatikus enzim, ami gyorsan kiszabadul a sejtekből, amennyiben azok megsérülnek, vagy elpusztulnak. A kísérlet alapelve a következő: A laktát-dehidrogenáz enzim laktátot alakít át piruváttá, miközben egy molekula NAD^+-ból egy molekula $NADH/H^+$ keletkezeik. A $NADH/H^+$-n található H/H^+ csoportot egy katalizáló enzim (diaphoráz) átviszi az INT((2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolium klorid) tetrazólium sóra. A reakció során a tetrazólium só formazán sóvá alakul, ami az oldat színváltozásával jár együtt, halványsárga színe pirossá alakul. A kit használati útmutatójában megadott inkubációs időn belül az oldat abszorbanciáját spektrofotométerrel meghatározzuk, és a keletkezett formazán só mennyisége arányos a csőben található sérült plazmamembránú, vagy elpusztult sejtekkel. A formazán só 500 nm-es hullámhosszon rendelkezik elnyelési spektrummal, míg a tetrazólium só ezen a hullámhossz tartományon gyakorlatilag nem nyel el fényt. A méréshez szükséges anyagokat a Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) (Roche, Indianapolis, IN, USA) tartalmazta. A gyártó előírása szerint, spektrofotométerrel történt a mérés. (ThermoFisher Luminoskan Ascent, Waltham, MA, USA)

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) BrdU inkorporációs mérés

Annak eldöntésére, hogy a sejtszámcsökkenés milyen természetű (citotoxikus vagy citosztatikus), mértük a sejtosztódás aktivitását a kezelést követően. Ehhez a Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche, Indianapolis, IN, USA) kitet használtuk. A vizsgálat elve a következő: A kit hatóanyaga az 5-bróm-2-deoxyuridin (5-Brdu). Ez a vegyület beépül a DNS-be, és hamis nukleotidként idő előtt terminálja a DNS szintézist. A kit tartalmaz egy fixáló oldatot, ami a sejtek genomiális DNS-ét elérhetővé teszi antitestek számára, valamint egy peroxidáz-konjugált antitestet, ami specifikus az 5-Brdu-ra. Az antitest kötődését követően a felülúszóhoz a peroxidáz szubsztrátját hozzáadva a DNS szintézissel egyenesen arányos színváltozás detektálható a csőben, melyet ELISA olvasóval mérhetünk. A gyártó előírása szerint, spektrofotométerrel történt a mérés. (ThermoFisher Luminoskan Ascent, Waltham, MA, USA)

3.2.4. RNS izolálás és kvantifikálás

Az RNS izolálás elengedhetetlen előzmény a sejt expressziós mintázatának vizsgálatához. Ehhez a High Pure RNA Isolation Kit-et (Roche, Indianapolis, IN, USA) használtunk. A sejtek lizálását követően a lizátumot átcentrifugáljuk egy speciális üvegszálas filtert tartalmazó csövön, ami megköti a nukleinsavakat. A megkötött DNS-t DNáz enzim használatával eliminájuk. Ezt követően a kontamináns anyagok (RT-PCR inhibitorok, sók, proteinek) eltávolítása történik többszörös centrifugálással. A megkötött, tisztított RNS-t végül elúciós pufferrel távolítjuk el a filterből. A megtisztított RNS-t MMLV reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-sé alakítottuk a gyártó instrukcióit követve (Promega, Madison, WI, USA). A génexpressziós vizsgálathoz kvantitatív valós idejű PCR módszert alkalmaztunk. 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 1x TaqMan universal PCR mastermix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) használatával. Az amplifikációhoz gén specifikus Taqman próba alapú eljárásokat alkalmaztunk, melyhez a következő protokollt használtuk: denaturáció (10 perc, 95 °C), majd 45 ciklus: denaturáció (95 °C, 10 mp), annelálás és elongáció (1 perc, 60 °C). A felhasznált gén specifikus Taqman szettek azonosítói a következők voltak: GAPDH: hs00167999_m1, CYP24A1: hs99999905_m1. Az mRNS relatív mennyiségének meghatározására a GAPDH mennyiségre normalizált értékeket használtunk. Minden mintát duplikátumokban vizsgáltunk ABI Prism 7500 real-time

PCR rendszeren (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A relatív mennyiségeket a 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg.

3.2.5. Statisztika

A különböző csoportok összehasonlítását ANOVA módszerrel végeztük, a post hoc tesztelés Tukey HSD teszt segítségével történt. Az SPSS 18 for Windows szoftver segítségével.

3.3. A WNT jelátviteli rendszer kapcsolata a D-vitamin és csontanyagcserével

3.3.1. Vizsgált populáció

A vizsgálatba 932 nem rokoni kapcsolatban álló, posztmenopauzás nőbeteget vontunk be. A posztmenopauzás csoportba történő besorolás kritériumai a következők voltak: 40 évnél magasabb életkor, és több, mint egy éve elmaradt menstruáció. Mértük a betegek magasságát, testsúlyát és rögzítettük a betegek életkorát. Teljes csípő és lumbális gerinc (L2-L4) BMD értékeket mértünk Lunar Prodigy DXA scanner (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) segítségével, majd kiszámítottuk a betegek T-score értékeit. A betegek 3 különböző diagnosztikai csoportba kerültek a T-score értékek alapján, ehhez a WHO ajánlásait vettük figyelembe. Azok a betegek, akiknek T-score értéke bármely mérési ponton kevesebb volt, mint -2,5, azokat osteoporosisosnak tekintettük. Akik -2,5 és -1,0 közötti T-score értékkel rendelkeztek bármely mérési ponton, az osteopeniás csoportba kerültek. Akiknek minden T-score értéke magasabb volt, mint -1,0, azok egészséges csont denzitással rendelkeztek. 385 betegtől rendelkeztünk részletes törési anamnézissel. Nem vertebrális osteoporoticus törésnek azokat az alacsony traumás töréseket vettük, amelyek a 40-ik életév után következtek be, és nem érintették az arcot, koponyát, kéz és lábujjakat, valamint a gerincet. Ebben a vizsgálatban a kompressziós csigolyatöréseket nem vizsgáltuk. A betegek egy alcsoportjában mértük a szérum D-vitamin értékeket (146 alany). Minden betegtől írásos beleegyezést kaptunk.

3.3.2. Egypontos nukleotid polimorfizmus (SNP) választás

Nyilvánosan elérhető adatbázisok segítségével választottuk ki a vizsgálni kívánt SNP-ket (http://genome.ucsc.edu/, http://www.genome.gov/gwastudies/, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) az LRP5, GPR177 és SP7 génekből.

9 SNP-t választottunk funkciójuk alapján, valamint figyelembe vettük, hogy az adott SNP feltűnt-e már korábban GWAS vizsgálatokban. Az első kritérium alapján misszenz SNP-ket választottunk, a második kritérium alapján pedig olyan SNP-ket, melyek p-értéke kisebb volt, mint 5×10^{-8}. (A kiválasztott SNP-ket, azok lokalizációját, illetve a p-értékeket ld. az Eredmények fejezetben)

Genotipizálás

A betegektől genomiális DNS-t gyűjtöttünk a buccalis nyálkahártya felszínének kaparékából. A DNS-t Roche HighPure PCR Template Purification kit-tel nyertük ki. A DNS minőségét, illetve mennyiségét NanoDrop B-100 spektrofotométerrel határoztuk meg. (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA Minden mintát 10 ng/ul koncentrációra higítottunk, a genotipizálást pedig egy Sequenom MassARRAY 4-es készüléken végeztük el.

3.3.3. Statisztikai vizsgálat

A betegeket 3 csoportba soroltuk a genotipizálási eredmény alapján: homozigóta recesszív, homozigóta domináns, illetve heterozigóta csoportokba. A csoportok normalitását és variancia homogenitását Shapiro-Wilk és Levene teszttel ellenőriztük. A csoportokat ANCOVA segítségével hasonlítottuk össze, post-hoc tesztként Bonferroni korrekciót használtunk. A BMD értékeket korra és BMI-re normalizáltuk. A teszteket SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A polimorfizmusok kapcsoltságát Haploview 4.0 programmal vizsgáltuk. A különböző gének kapcsolatait az R programnyelv SNPassoc függvény csomagjával vizsgáltuk. Az alfa-értéket 0,05-nek választottuk.

4. Eredmények

4.1. A 24-hidroxiláz (CYP24A1) és 1-alfa hidroxiláz (CYP27B1) gén, valamint fehérje szintű expressziós vizsgálata differenciált pajzsmirigy tumorokban

4.1.1. A vizsgált populáció és a minták leíró statisztikája

A vizsgálatban 31 férfi és 69 nő vett részt. Az átlagos életkor 49.1 év volt (13-85 év) és a vizsgált betegek 42%-a volt 45 évesnél fiatalabb. 56 konvencionális PTC és 44 PTC szövettani variáns (follikuláris, Hürthle-sejtes, magas sejtes, enkapszulált vagy mikrocarcinoma) volt a mintáink között. Az AJCC/UICC 2010 kritériumrendszer szerint, 72 I-es stádiumú, 6 II-es stádiumú és 22 III-as stádiumú daganatot azonosítottunk. Összesen 52 BRAF, 2 HRAS, 1 KRAS és 4 NRAS mutációt, 1 ELE/RET és 8 CCDC6/RET átrendeződést találtunk. 38 mintában nem detektáltuk a vizsgált szomatikus mutációkat, 6 minta pedig két különböző mutációt is hordozott. NRAS és BRAF mutáció együttesen 3 daganatban fordult elő, egy II-es stádiumú és két III-as stádiumú mintában. Két mintában volt BRAF és CCDC6/RET átrendeződés, ebből egy III-as stádiumú és egy I-es stádiumú volt, mindkét esetben regionális nyirokcsomó metasztázisokkal. Egy tumorban volt KRAS és BRAF mutáció, ez a tumor I-es stádiumú volt nyirokcsomó metasztázis nélkül. A papilláris típusú carcinoma mellett 31 mintában volt más pajzsmirigybetegség is (Hashimoto, struma göbök, hyperfunkció illetve gátlószeres kezelés következményei).

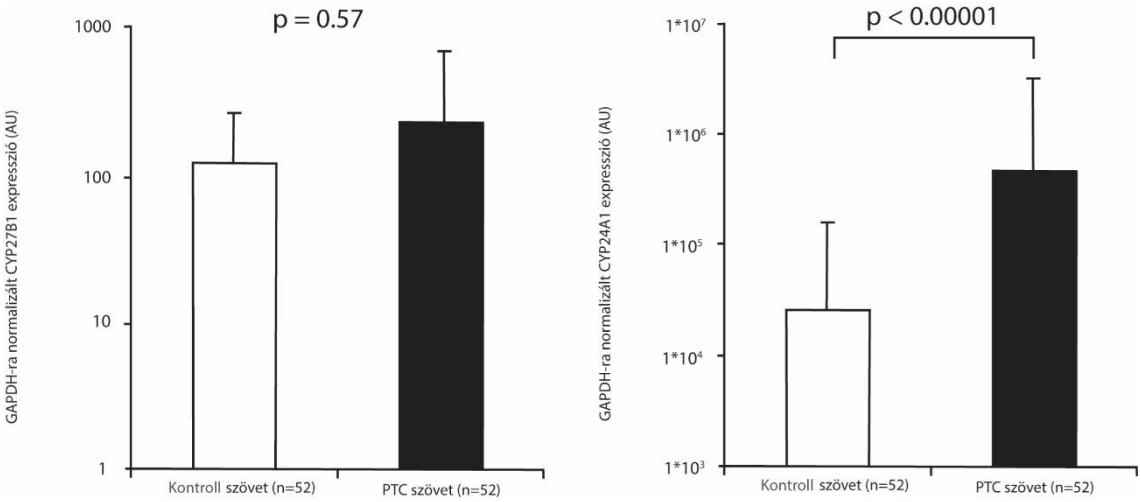
4.1.2. A CYP24A1 és CYP27B1 gének expresszió változása papilláris tumorszövetben a saját ép kontrollhoz képest

A CYP24A1 expresszió jelentősen emelkedett 52 papilláris karcinóma esetében a saját tumor mentes szövethez képest, ebből volt olyan, amelyiknél ezerszeres expresszió növekedést mértünk. Ezekben a mintákban a CYP24A1 GAPDH-hoz viszonyított relatív emelkedése statisztikailag szignifikáns, a p-érték 0,00001-nél kisebb volt. 24 rosszindulatú tumorban csökkent CYP24A1 expressziót tudtunk kimutatni. 13 esetben az egészséges kontroll és a tumoros szövet között nem volt statisztikailag szignifikáns

eltérés. 11 mintapárban a CYP24A1 mRNS nem volt mérhető. 69 formalin fixált (FFPE) és 31 friss fagyasztott mintából izoláltunk RNS-t. Az mRNS expresszió mintázatában a két mintatípus között nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés.

A betegek 31%-a rendelkezett valamilyen pajzsmirigyet érintő társbetegséggel, így az ő kontroll mintájuk nem tekinthető egészségesnek. Ennek ellenére e betegek kontroll mintái és a társbetegséggel nem rendelkező betegek kontroll mintái között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a CYP24A1 mRNS relatív mennyiségében (dCt: 11,0 vs. 8,33, p=0,13). A CYP24A1 expresszió nem mutatott összefüggést a betegek nemével (r=0,019), illetve életkorával (p=0,97).

A CYP27B1 expressziója nem mutatott különbséget a tumoros és a normál szövetekben. A CYP27B1 gén kifejeződésének relatív eltérése az esetek 90%-ában nem érte el a küszöbértéket, a kétszeres vagy azt meghaladó változást (A GAPDH kifejeződésre normalizált relatív expressziós változás átlaga: 0,88±0,44). (5. ábra)

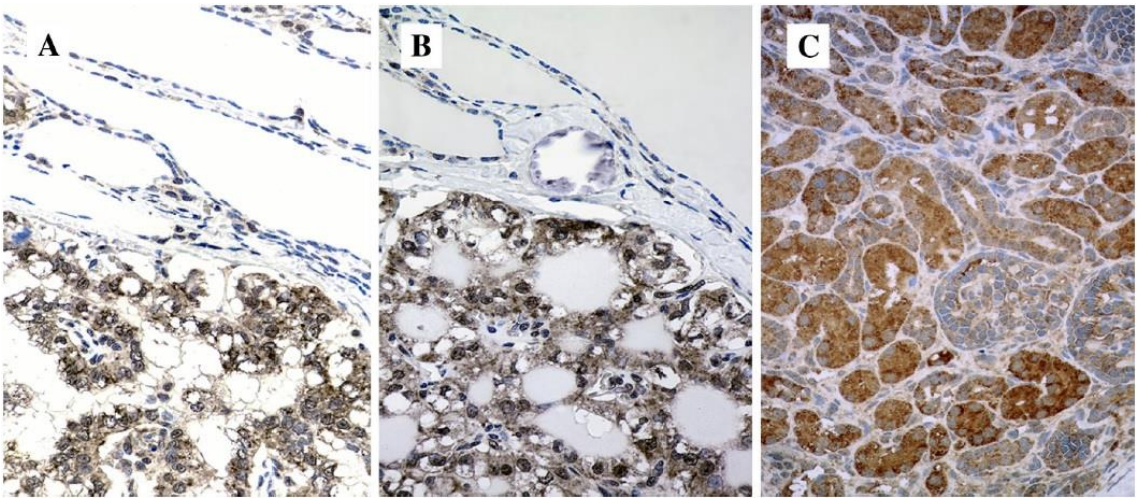


5. ábra: Az ábra a CYP27B1 ill. a CYP24A1 mRNS expresszióját mutatja. Bal oldalon láthatjuk, hogy nincs statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll csoport és a tumoros csoport között a CYP27B1 expresszió tekintetében, míg a CYP24A1 expresszió a tumorokban szignifikáns emelkedést mutat.

4.1.3. CYP24A1 fehérjeszintű expressziója immunhisztokémiai módszerrel

Azokban a mintákban, amelyekben CYP24A1 mRNS kimutatható volt, immunhisztokémiai festést végeztünk. A tumoros szövetben erős festődés volt kimutatható a környező nem tumoros szövetekhez képest, azokban a daganatokban, ahol

a CYP24A1 mRNS szintje is emelkedett volt. A tumoros papillák diffúz, granuláris, citoplazmatikus valamint kisfokú magi festődést mutattak, ellentétben a normális szövettel, amelyben nem vagy alig látható CYP24A1 festődés. (6. ábra) Azokban a tumorokban, ahol nem volt mérhető CYP24A1 emelkedés, a kontroll és a tumoros minta nem mutatott eltérő CYP24A1 festődést. Az immunhisztokémia mindig azonos eredményt adott, mint a qPCR, minden esetben emelkedett fehérje mennyiség követte az mRNS szint emelkedését.

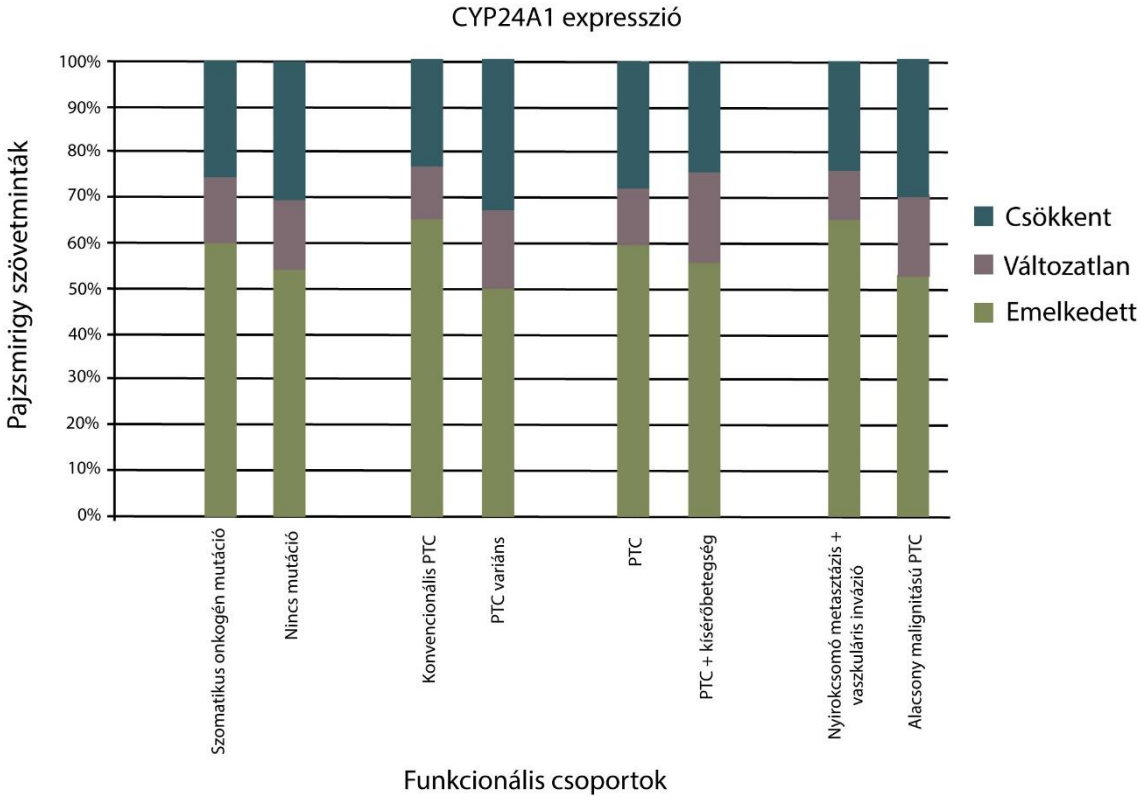


6. ábra: A CYP24A1 immunhisztokémiai detektálása PTC szövetben. Az A és B jelű felvétlen egészséges peritumoralis folliculusokat (a képek felső része), illetve PTC szövetet láthatunk (a képek alsó része). Látható, hogy a tumoros szövetben kifejezettebb a CYP24A1 expresszió. A C jelű képen egészséges veseszövet látható, mint pozitív kontroll.

4.1.4. A papilláris tumorminták funkcionális és patológiai alcsoportok szerinti felosztása és a CYP24A1 gén kifejeződése

A különböző csoportok CYP24A1 expressziója tendenciózus volt, de – Khí-négyzet teszttel vizsgálva - statisztikailag nem szignifikáns. Gyakrabban figyeltünk meg CYP24A1 emelkedést azokban a mintákban, melyek szomatikus onkogén mutációkat hordoztak (60,7 vs. 54,5%). A konvencionális PTC minták nagyobb CYP24A1 emelkedést mutatnak, mint az egyes PTC altípusok (65,3% vs. 50,0%). Azokban a betegekben, akikben a PTC mellett nem volt jelen pajzsmirigy társbetegség, magasabb CYP24A1 expressziót mértünk (59,4 vs. 56,0%). Mindemellett a CYP24A1 expresszió

hajlamos volt nagyobb emelkedést mutatni azokban a PTC mintákban, amelyeknél vaszkuláris invázió és/vagy nyirokcsomó metasztázisok voltak jelen. (7.ábra)

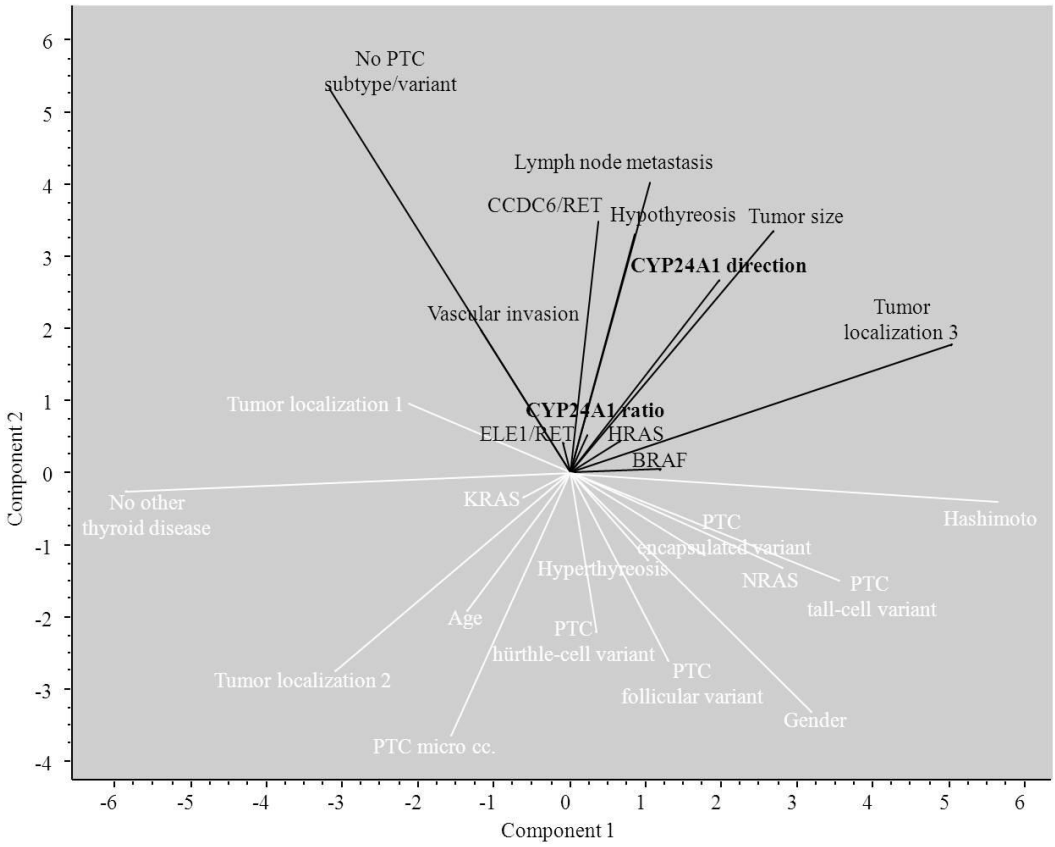


7. ábra: Emelkedett expressziójú, változatlan és alacsony expressziójú minták aránya a négy funkcionális alcsoportban. A kétszeres expressziós különbséget használtuk cutoff értékként az emelkedett illetve csökkent expresszió meghatározására. A vizsgálatban az alacsony malignitású PTC kritériumaként a McLeod és mtsai által felállított rendszert használtuk. (1)

4.1.5. A CYP24A1 expresszió, valamint a tumorszövet egyéb hisztológiai és genetikai jellemzőinek multiparaméteres főkomponens analízise

A PCA diagram megmutatja a kapcsolatot a 26 vizsgált demográfiai, klinikai, szövettani és genetikai változó között a 86 PTC mintában. Az első két főkomponens a teljes variabilitás 10,4 és 9%-át magyarázza meg. Az emelkedett CYP24A1 génexpressziós ráta és a tumor malignitást jelemző értékek (érinvázió, nyirokcsomó metasztázis, tumorméret) között pozitív összefüggés mutatkozik a 2. tengelyen. Az életkor és a papilláris mikrocarcinoma negatív korrelációt mutatott ezzel az adatcsoporttal. Azok a tumorok, amelyek mindkét lebenyt érintik, pozitív összefüggésben állnak a tumor térfogattal. HRAS, KRAS és ELE/RET mutációt kevés mintában találtunk, ezért ezek az adatok a centroid régióban helyezkednek el, belőlük következtetéseket nem vonhatunk le. A

tumorspecifikus CYP24A1 mRNS szint, melyet a saját kontroll szövetre normalizáltunk, kevéssé befolyásolja az adatok kiértékelését. (8. ábra)



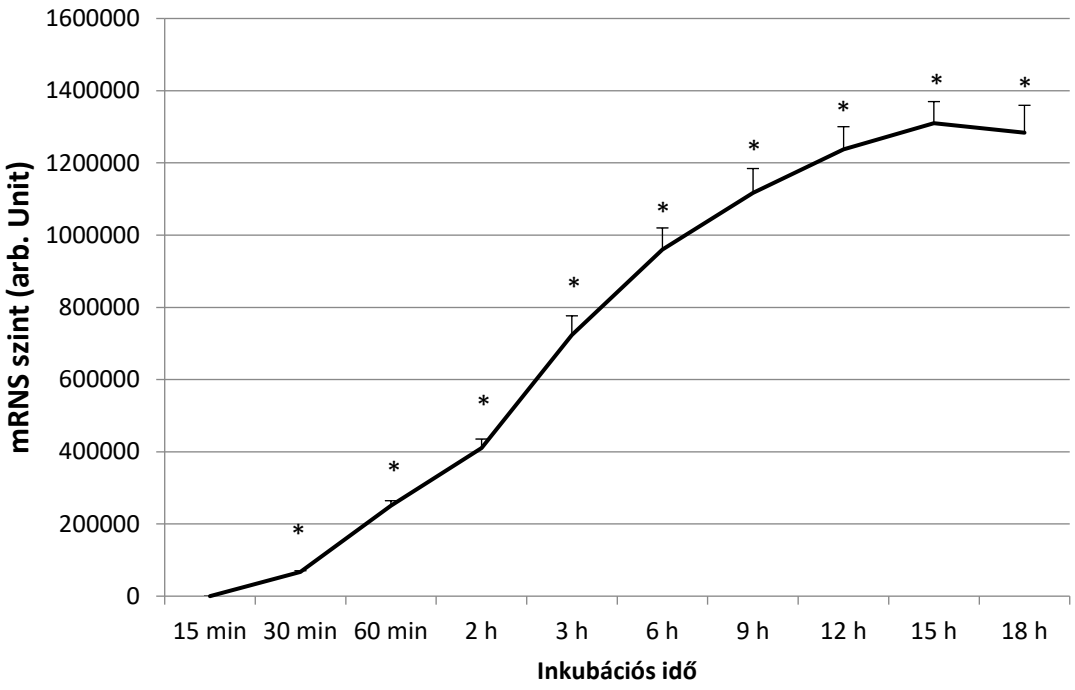
8. ábra: A főkomponens analízis ordinációs diagramja. Az ábrán feketével jelölt változók asszociációt mutatnak a CYP24A1 expresszióval. Pozitív korrelációt találtunk a CYP24A1 expresszió, valamint a malignitást tükröző klinikai paraméterek (nyirokcsomó metasztázis, tumor méret, érbetörés), az ELE1/RET, HRAS, BRAF onkogén mutációk, valamint a klasszikus PTC hisztológia között.

4.2. D-vitamin kezelés és a 24-hidroxiláz (CYP24A1) gátlásának vizsgálata in vitro humán colontumor sejtvonalon

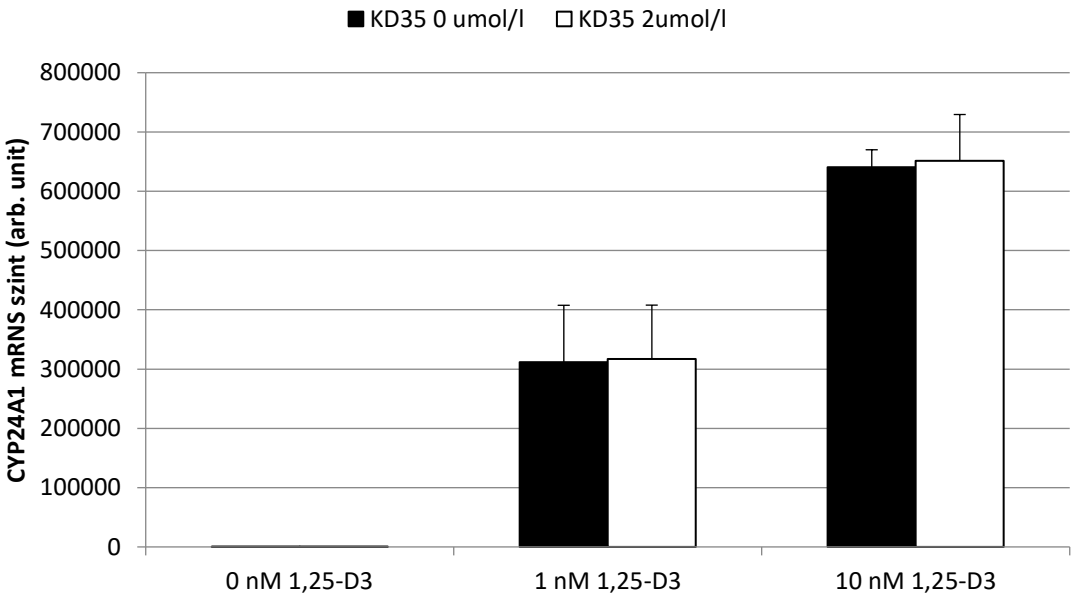
4.2.1. A CYP24A1 expresszió idő- és koncentrációfüggő változásai 1,25-D3 vitamin kezelést követően CACO-2 sejteken

A CYP24A1 mRNS expresszió emelkedésében már nagyon rövid inkubációs idő után is 6 nagyságrendbeli változás figyelhető meg. Az mRNS szint emelkedését már az inkubáció 30-ik percében ki tudtuk mutatni, míg a maximumát 12-16 órával a 1,25-D3-

DOI:10.14753/SE.2018.2136



9. ábra: A CYP24A1 mRNS szintje CaCO2 sejtekben 100 nmol/l D-vitamin hozzáadását követően. Mint látható, 30 perccel az inkubációt követően szignifikáns emelkedés mutatható ki, mely 12-16h múlva éri el a csúcspontját.



10. ábra: A KD35 vegyület nem befolyásolja a CYP24A1 mRNS expressziót. Mint látható, mind a vegyület jelenlétében, mind anélkül ugyanolyan mértékű emelkedés detektálható.

vitamin adást követően érte el (ld. 9. ábra). 4 órával az inkubáció kezdete után 1 ill. 10

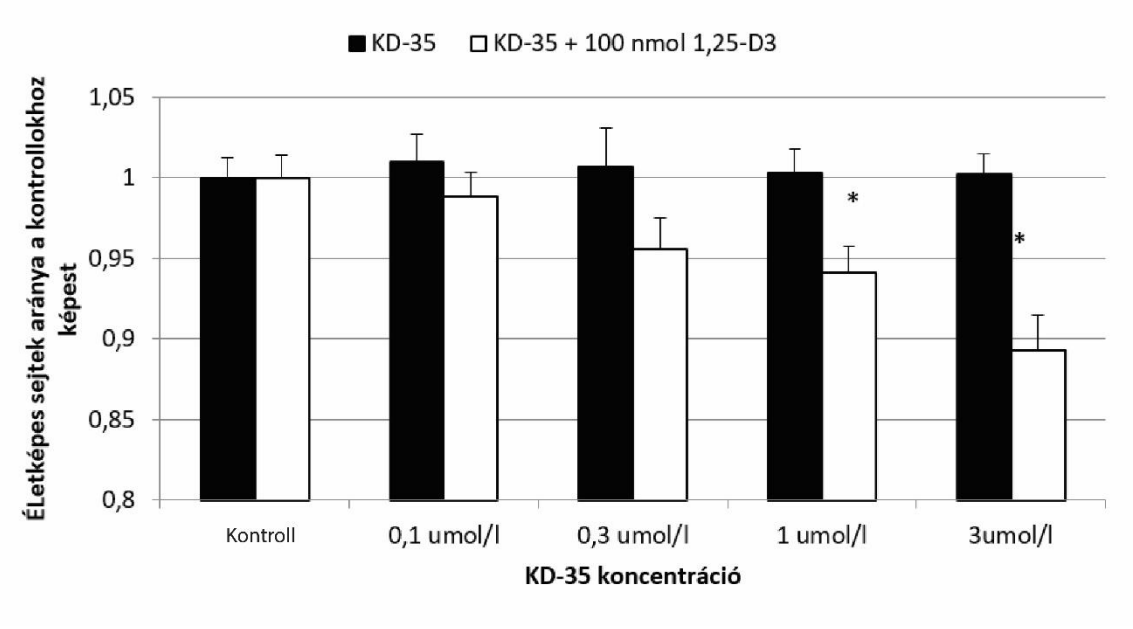
nmol/l-es 1,25-D3-vitamin koncentráció mellett a CYP24A1 mRNS szintje 311,405-szörösre, illetve 612,801-szeresre emelkedett a kezeletlen sejtekéhez képest. (ld. 10. ábra)

4.2.2. Tetralon származékok és a CYP24A1 inhibitor, KD-35 vegyület hatása a CACO-2 sejtvonalra

Előzetes vizsgálatok során kimutattuk, hogy bizonyos szintetizált tetralon származékok in vitro képesek voltak csökkenteni a CACO-2 sejtek számát D-vitamin jelenlétében. Ezeket a vegyületeket változó koncentrációban (1 nmol/l-től 10 umol/l–ig), többféle inkubációs idővel (1 naptól 4 napig) vizsgáltuk. Az SRB festéses tesztek eredményei alapján a KD-35 jelű vegyületet választottuk ki további vizsgálatok céljából. Ezen vegyület önmagában nem befolyásolta a sejtek életképességét, azonban D-vitamin jelenlétében koncentráció függően csökkentette a sejtszámot.

4.2.3. Sejtéletképesség (SRB) mérés eredménye

A CACO-2 sejtvonalat 4 napig inkubáltuk 100 nmol/l 1,25-D3-vitamin és 0.1, 0.3, 1,0 ill. 3,0 umol/l KD-35 jelenlétében. A kezelés hatására a sejtek SRB festődésében (vagyis a sejtek életképességében) koncentrációfüggő (2.17, 5.07, 6.18 ill. 10.93%-os) csökkenést figyeltünk meg azokhoz a kontrollsejtekhez képest, amelyeket csak 100 nmol/l-es D-vitamin koncentráció mellett, CYP24A1 gátló KD-35 nélkül tenyészettünk. (11. ábra)

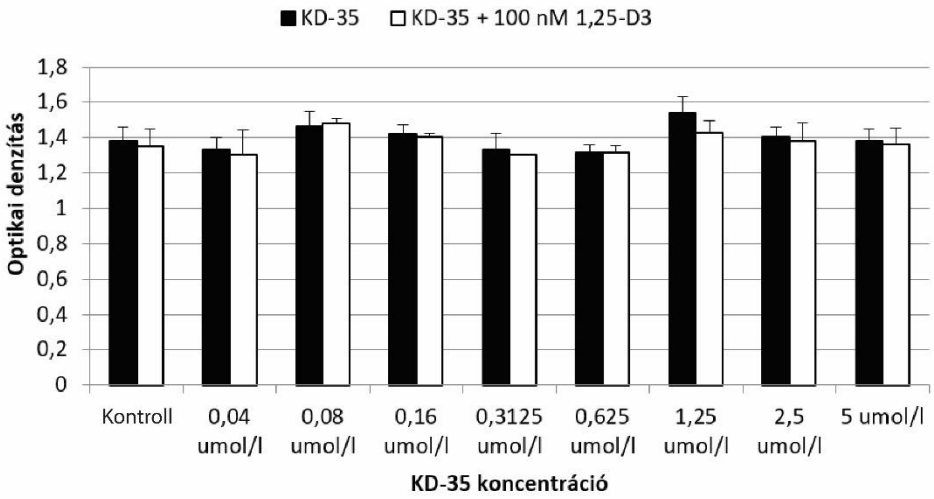


11. ábra: Az SRB tesztek eredménye a KD-35 vegyület és D-vitamin jelenlétében. Látható, hogy a vegyület koncentrációfüggően csökkenti a sejtekben szintetizálódó fehérjék mennyiségét.

4.2.4. A citotoxicitás tesztek eredménye

Hogy meghatározzuk a KD-35 vegyület által okozott sejtszám csökkenés természetét, a sejteket citotoxicitás mérésnek vetettük alá. Az általunk használt módszer a sejtfelülúszó laktát-dehidrogenáz (LDH) koncentráció mérésén alapul. A sejtek kezeléséhez használt KD-35 koncentráció 0,04 és 5 umol/l között változott, az 5 umol/l-es koncentrációs plafont a sejtéletképességi vizsgálatok alapján választottuk. A CACO-2 kultúra egyik részét csak KD-35 gátló szerrel a másik részét csak 100 nM 1,25-D3-vitaminnal kezeltük. Minden mérést 3 párhuzamossal végeztünk, 4 napos inkubációs idő mellett. Egyik kísérleti felállásban sem tudtunk kimutatni jelentős változást a sejtfelülúszó LDH koncentrációjában. Ez arra enged következtetni, hogy a vegyület által közvetített sejtszámcsökkenés oka nem citotoxikus reakció. (ld. 12. ábra)

DOI:10.14753/SE.2018.2136

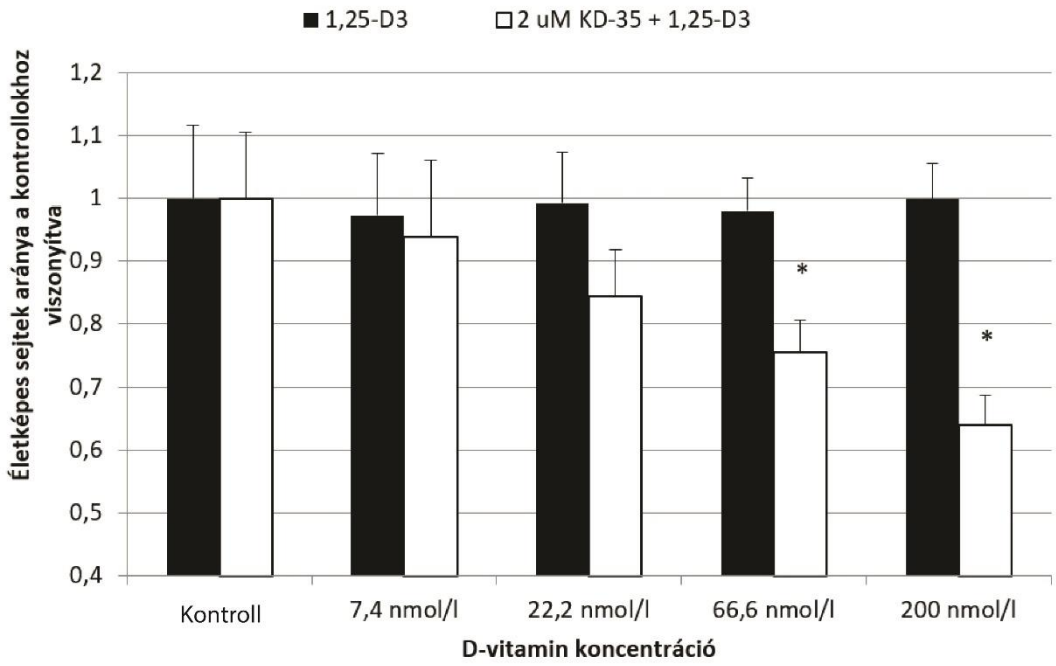


12. ábra: A KD-35 koncentráció összefüggése az LDH koncentrációjával. A kontroll sejtekhez képest a vegyület nem változtatta a felülúszó LDH aktivitását, mely a sejtszétesés ellen szól.

4.2.5. A sejtproliferációs esszé eredménye

A CACO-2 sejtvonalon 2 umol/l KD-35 mellett változó 1,25-D3-vitamin koncentrációkat használtunk, a következők szerint: 7,4; 22,2; 66,6 ill. 200 nmol/l. A kontroll sejteket csak KD-35-tel kezeltük. 4 napos inkubációs időt használtunk. Ezt követően a sejteket 2 órán át 5-BrDU-val jelöltük. A kontrollhoz viszonyított relatív sejtproliferáció csökkenés 3,43, 14,81, 22,49, ill. 35,81% volt, arányosan az alkalmazott növekvő 1,25-D3-vitamin koncentrációkkal. (13. ábra)

DOI:10.14753/SE.2018.2136

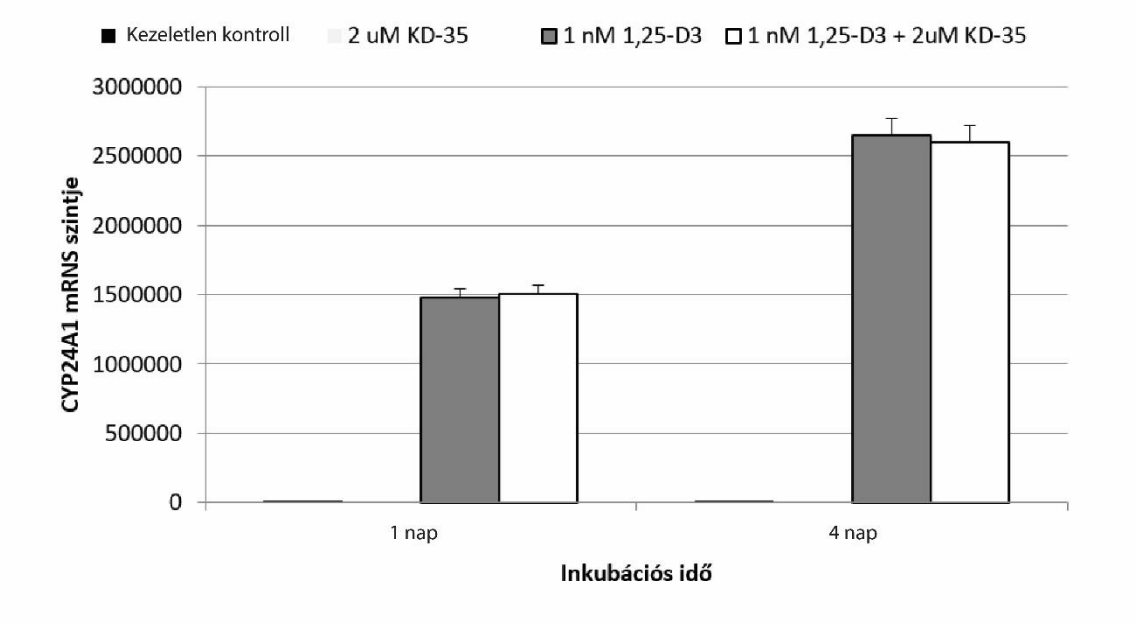


13. ábra: Életképes sejtek aránya az 5-BrDU inkorporációt követően. Látható, hogy a KD-35 vegyület koncentráció függően csökkenti az életképes sejtek arányát. 66,6 nmol/l koncentráció felett a csökkenés statisztikailag szignifikáns. (p<0,05)

4.2.6. Változások a CYP24A1 mRNS expresszióban 1,25 D3-vitamin és KD-35 vegyület hatására a CACO-2 sejtvonalon

Az expresszált CYP24A1 specifikus mRNS szintje nem változott szignifikánsan azokban a sejtekben, amelyeket KD-35-tel is kezeltünk, azokhoz képest, amelyeket csak 1,25-D3-vitaminnal inkubáltunk. A KD-35 önmagában nem növelte a CYP24A1 expressziót. Míg D-vitamin jelenlétében a CYP24A1 expresszió meredeken emelkedett. A CYP24A1 mRNS szintje nem függött sem a KD-35 koncentrációtól, sem az inkubációs időtől. (14. ábra)

DOI:10.14753/SE.2018.2136



14. ábra: A fenti ábrán a CYP24A1 mRNS szintjét ábrázoltuk az inkubációs idő függvényében. Mint látható, a KD-35 vegyület önmagában nem eelte meg a CYP24A1 szintet. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy a vegyület hatását nem a VDR serkentésén keresztül fejti ki, hisz ebben az esetben a negatív feedback mechanizmussal önmagában emelné a CYP24A1 mRNS szintet. A D-vitamin mind önmagában, mind a tetralon származék jelenlétében emelte a CYP24A1 mRNS szintet.

4.3. A WNT jelátviteli rendszer kapcsolata a D-vitamin és csontanyagcserével

4.3.1. A vizsgált betegek leíró statisztikája

A vizsgálati csoport leíró statisztikája az 1. táblázatban látható. Az egyes csoportok között a BMI-ben nem volt szignifikáns különbség ($p > 0,05$). A csoportok közötti életkor szignifikáns különbséget mutatott, az egészséges csontozattal rendelkező betegek szignifikánsan alacsonyabb életkorral rendelkeztek mind az oszteopéniás, mind a porotikus csoporthoz képest. Az oszteopéniás és az oszteoporózisos csoportok közt nem volt különbség az életkorban ($p <0,05$, átlag ± SD: 57,3 ± 8,7, 62,3 ± 9,9, 63 ± 10,0, az egészséges, oszteopéniás ill. oszteoporózisos csoportokban). Az eredeti 932 mintából 43 esetben nem tudtunk a genotipizáláshoz elegendő mennyiségű vagy minőségű gDNS-t izolálni, így ezeket kihagytuk a további analízisből. A publikált adatok a maradék 889 minta eredményein alapulnak. Az 2. táblázatban a vizsgált nők denzitometriás paraméterei láthatóak.

1. táblázat: A vizsgált betegcsoport leíró statisztikája.

N=889	Átlag	±Std.Dev.
Kor (évek)	61,05579	9,951067
BMI (kg/m^2)	28,06399	4,800989
Gerinc (L2-L4) BMD (g/cm^2)	0,823829	0,326662
Gerinc T-score	-1,60151	1,173225
Teljes csípő BMD (g/cm^2)	0,755713	0,121174
Teljes csípő T-score	-1,83702	1,102675

2. táblázat: Az egyes betegcsoportok összehasonlítása. A kontroll csoportba azokat a betegeket vettük be, akik egyetlen mérési ponton sem mutattak -1,00-nél alacsonyabb T-score értéket. Az oszteopéniás csoportba azok a betegek kerültek, akik bármely mérési ponton -1,00 és -2,50 közötti T-score-t mutattak Az oszteoporózis csoportban a betegek valamely mérési ponton -2,50 alatti T-score-ral rendelkeztek. A táblázatban az átlagot, illetve a standard deviációt tüntettük fel.

A vizsgált betegcsoportok		Átlag	±SD*
Egészséges kontroll	Gerinc BMD (g/cm^2)	1,08	0,31
N=90	Gerinc T-score	-0,13	0,62
	Teljes csípő BMD (g/cm^2)	0,96	0,086
	Femur T-score	-0,18	0,64
Oszteopénia	Gerinc BMD (g/cm^2)	0,86	0,33
N=455	Gerinc T-score	-1,29	0,82
	Teljes csípő BMD (g/cm^2)	0,79	0,12
	Teljes csípő T-score	-1,56	0,65
Oszteoporózis	Gerinc BMD (g/cm^2)	0,71	0,27
N=344	Gerinc T-score	-2,35	1,14
	Teljes csípő (g/cm^2)	0,67	0,11
	Teljes csípő T-score	-2.61	0.99

4.3.2. Genotipizálási eredmények

A genotipizálási eredmények általános áttekintése az 3-as táblázatban látható. Az összes genotipizált SNP követte a Hardy-Weinberg eloszlást. A genotipizálási ráta minden SNP

esetében elérte vagy meghaladta a 98,54%-ot. Egy vizsgált SNP (SP7 rs191240606) monomorfikus volt annak ellenére, hogy az 1000 genom projekt minden populációjában polimorfikusnak mutatkozott. Ez az SNP nem szerepel a HapMap adatbázisban. A genotipizált SNP-k a GPR177 génben két, az LRP5 génben egy haplotípus blokkot alkottak.

*3. táblázat: A vizsgált SNP-k hatása a csonttömegre. A táblázatban az egyes SNP kromoszomális, illetve génen belüli elhelyezkedése ábrázolódik. A kapott eredményekből Hardy-Weinberg equillibrium tesztet (HWE teszt) számoltunk. Az SNP mindegyike követte a HWE eloszlást. Látható, hogy az rs4988300 SNP alléljai statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatnak a BMD értékekkel. * MAF: Minor allél fekvencia, ** HWE-teszt: Hardy-Weinberg Equillibrium teszt, + p-érték (α < 0,05), vastagon szedve azok a p-értékek, melyek post-hoc teszttel is szignifikánsnak igazolódtak.*

Gene	SNP rsID	SNP pozíció	Gén	SNP lokalizáció	Genotípizálási ráta [%]	MAF*	Allél	HWE-Teszt**	BMD hatás (p-érték)†	T-score hatás (p-érték)††
GPR177	rs1430742	chr1:68635075	GPR177	intron	98,54	0,209	G/A	0,2991	0,379	0.310
	rs2566755	chr1:68635390	GPR177	intron	99,78	0,21	A/G	0,3822	0,260	0.169
	rs2566785	chr1:68604094	GPR177	nem kódoló RNS	99,78	0,39	A/G	0,4963	0,881	0.399
	rs983034	chr1:686035086	GPR177	exon	99,44	0,389	C/T	0,5216	0,456	0.550
LRP5	rs4988300	chr11:68088831	LRP5	intron	99.78	0,463	G/T	0,4399	***0,004***	0.079
	rs599083	chr11:68192346	LRP5	intron	98,65	0,313	G/T	0,7046	0,615	0.040
	rs634008	chr11:68094741	LRP5	intron	98,99	0,443	C/T	0,6447	0,017	0.034
SP7	rs191240606	chr12:53722883	SP7	exon	99,89	0,00	C/A	1,00	-	-
	rs2016266	chr12:53727955	SP7	intron	99,78	0,315	A/G	0,5534	0,231	0.096

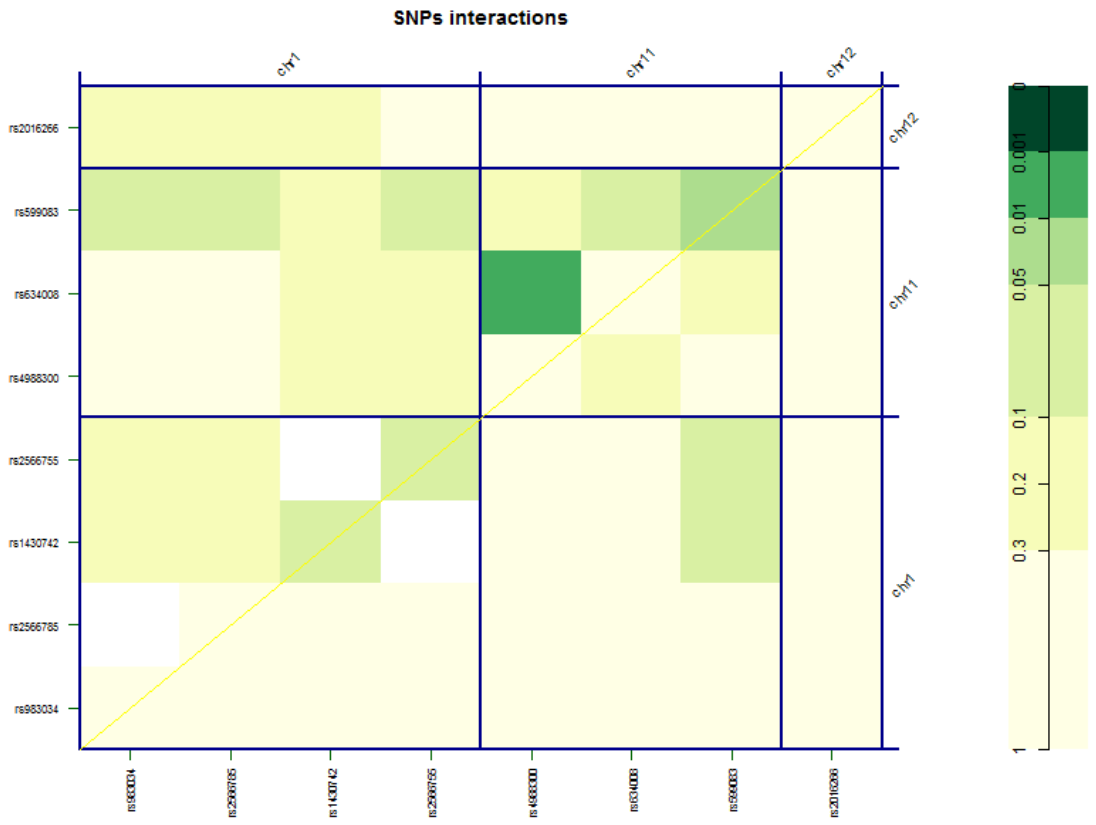
4.3.3. Az LRP5 gén polimorfizmusainak hatása a csonttömegre és a törési kockázatra

Vizsgálatunk azt találtuk, hogy az LRP5 gén rs4988300 és az rs64008 számú SNP-i összefüggést mutatnak a csonttömeggel. Bonferroni korrekciót követően az rs4988300 hatása mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak (p=0,004). Azok a nők, akik a vizsgált SNP heterozigóta genotípusát hordozták, szignifikánsan magasabb csípő BMD értékkel rendelkeztek. További összefüggést tudtunk kimutatni a csípő T-score értékek és az rs599083, rs634008 SNP-k között (p=0,040, p=0,034), de ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak a Bonferroni korrekciót követően. Nem sikerült kimutatni összefüggést az osteoporoticus törések és a vizsgált LRP5 genotípusok között.

4.3.4. Az LRP5 gén haplotípus analízisének eredményei és gén-gén interakciók

A gén-gén interakciós ábra elkészítését a SNPassoc programcsomag segítségével végeztük (66). Az elemzés során az LRP5 gén két SNP-je (rs634008, rs599083) és a gerinc BMD között találtunk összefüggést (p = 0,009), de a Bonferroni korrekciót követően az eredmény nem volt statisztikailag szignifikáns. (15.ábra) Más SNP-k közt nem vetődött fel az interakciók lehetősége. A haplo.stats csomag haplo.score függvényét használva nem tudtunk összefüggést kimutatni a vizsgált haplotípusok és a BMD valamint T-score értékek között.

DOI:10.14753/SE.2018.2136



15. ábra: SNP interakciók a vizsgált géneken. Az rs 4988300 és az rs634008 SNP-k között mutatkozott szignifikancia szintet elérő összefüggés, azonban a post hoc tesztek során ez fals pozitívnak bizonyult.

4.3.5. A GPR177 és SP7 gének hatása a csonttömegre, valamint a törési kockázatra

Nem tudtunk összefüggést kimutatni a két gén vizsgált SNP-i és a csonttömeg között. A vizsgált genotípusok nem mutattak összefüggést a törési kockázattal egyetlen törési ponton sem.

4.3.6. A vizsgált polimrizmusok és a keringő D-vitamin szint összefüggése

Nem találtunk összefüggést a keringő D-vitamin koncentrációja és a vizsgált polimorfizmusok között.

5. Megbeszélés

5.1. CYP24A1 expresszió és CYP24A1 gátlás tumorokban

5.1.1. CYP24A1 expresszió pajzsmirigy daganatokban

Vizsgálatunk során 100 papilláris carcinomában szenvedő betegtől gyűjtöttünk egészséges ill. daganatszövet mintákat. A vizsgálat újdonsága az, hogy a betegek tumor szövetét a saját egészséges szövethez tudtuk hasonlítani a CYP24A1 expresszió tekintetében. A CYP24A1 és CYP27B1 expresszión kívül meghatároztuk a BRAF, HRAS, KRAS, NRAS onkogének mutációs státuszát, valamint az ELE1/RET és a CCD6/RET génátrendeződések jelenlétét. A genetikai eredményeket összevetettük számos klinikai és hisztológiai adattal. A vizsgált papilláris pajzsmirigy daganatok több, mint felében emelkedett CYP24A1 expressziót láttunk. Az immunhisztokémiai festés eredményei összhangban voltak a PCR vizsgálati eredményekkel. A fokozott fehérje festődés megfigyelhető volt a daganatos szövetekben a kontrollokhoz képest. Szintén észrevehető volt bizonyos trend a CYP24 mRNS expresszió és különböző PTC hisztológiai variánsok között.

A pajzsmirigy daganatok a leggyakoribb endokrin neopláziák (Az USA-ban újonnan diagnosztizált daganatok 1-1,5 %-a). (67) Az 1973-2003 közötti periódusban a pajzsmirigy daganatok incidenciája 189%-kal növekedett. (68) A daganat megelőzésében a D-vitamin szerepe egyelőre nem egyértelmű, további vizsgálatok váratnak magukra. Sikerült egy jelentős CYP24A1 enzim expresszió emelkedést kimutatnunk a szövetminták több, mint felében, ezzel egyidejűleg a szintetizált fehérje mennyiségének emelkedését is bizonyítani tudtuk. A megfigyelt emelkedés a korábban a CRC esetében ismertetett, úgynevezett „önvédelmi mechanizmus” lehet a kalcitriol tumorellenes hatásával szemben. Sharma és mtsai azt figyelték meg, hogy in vitro pajzsmirigydaganat-sejtvonalak CYP24A1 expressziója emelkedik. (52) Clinckspoor és mtsai. azonban egy a miénknél kisebb, 38 mintából álló csoportban alacsonyabb arányban (kb. 18%-ban) tudtak emelkedett CYP24A1 expressziót mérni. (69) A mi csoportunk által végzett vizsgálat mellett szól a nagyobb mintaszám, és a kontroll ill. tumoros csoportok

stratifikálása azáltal, hogy ugyanazon páciensből szereztük mind a kontroll, mind a tumoros mintát is.

Eredményeink azt mutatják, hogy a CYP24A1 mRNS expresszió kifejezettebb azokban a mintákban, ahol nyirokcsomó metasztázis és/vagy vaszkuláris invázió is jelen volt. Egy korábbi vizsgálat azonban azt találta, hogy az N1 stádiumú tumorok alacsonyabb CYP24A1 expressziós szintekkel rendelkeznek, mint az N0 stádiumú tumorok (fehérje szinten 18% a 11%-kal szemben). (70) Ebben a vizsgálatban azonban nem közölték a statisztikai szignifikancia szinteket.

Papilláris pajzsmirigy daganatokban több különböző mutáció is jelen lehet (RAS, RET, BRAF). (71) Megvizsgáltuk, hogy az eddig leírt genetikai eltérések és a CYP24A1 expresszió között kimutatható-e összefüggés. Főkomponens analízis segítségével arra a következtetésre jutottunk, hogy enyhe összefüggés található a vizsgált mutációk és a CYP24 expresszió között, azonban ez az eredmény további vizsgálatok tárgya kell, hogy legyen.

Khadzkou és mtsai. bizonyos fokú tendenciát láttak CYP27B1 expresszió esetén arra, hogy a PTC minták magasabb CYP27B1 expresszióval rendelkeznének, mint a normál pajzsmirigy szövet. (72) Ezt a mi vizsgálatunk nem erősítette meg, Sharma és mtsai kutatásához hasonlóan mi is azt a következtetést tudtuk levonni, hogy nincs szignifikáns összefüggés a PTC és a CYP27B1 enzim expressziója között in vivo. (52)

5.1.2. CYP24A1 gátlás colorectalis carcinoma sejtekben

Sikerült azonosítanunk egy új vegyületet, a KD-35-öt, amely D-vitamin jelenlétében hatékonyan képes gátolni a vastagbél daganatsejtvonal (CACO-2) osztódását.

A CYP241 enzim, amely a CYP450 enzimcsalád egyik tagja, kulcsenzim a D-vitamin aktív formájának eliminálásában, és így a D-vitamin szint szöveti szintű szabályozásában. A CYP450 enzimek mindannyian rendelkeznek egy hem-doménnel az aktív helyen. Kétféle enzimblokkoló vegyület létezik: az azol és a nem azol-típusú vegyületek. (73) Az azol-típusú gátlószerek N-heterociklusos gyűrűje közvetlenül a hem-csoport vas atomjához kötődik. Ez egy nagyon hatékony gátlást jelent, azonban ez nem egy szelektív

reakció. Mivel a CYP27A1 és CYP27B1 enzimek is a CYP450 családba tartoznak, így van hem-csoportjuk, az azol-típusú vegyületek nem szelektív gátlómechanizmusa az aktiválásban részt vevő enzimeket is gátolná, ami a mi esetünkben nem volna szerencsés.

A nem azol-típusú vegyületek hatásukat hidrogén kötések és hidrofób kölcsönhatások révén fejtik ki. Ugyan ez a mechanizmus kevésbé potens, ám jóval szelektívebb gátlást tesz lehetővé. (62) 13 tetralon (nem azol-típusú) vegyületet vizsgáltunk, hogy azonosítsunk egy olyan szert, ami nehezen szívódik fel, és helyileg fejti ki a hatását komoly szisztémás mellékhatások nélkül. A 13 vizsgált vegyület nagyrésze vagy toxikus vagy hatástalan volt még D-vitamin jelenlétében is. Csak a KD-35 vegyület gátolta a sejtek növekedését D-vitamin jelenlétében a tetralon vegyület toxicitásának megléte nélkül. A 3 hatásos tetralon származék közül két vegyület nagyobb toxikus potenciálllal rendelkezett önmagában, ezért ezeket kizártuk a további vizsgálatokból.

Felmerül a kérdés, hogy a KD-35 esetében ténylegesen az enziminhibíció áll-e a hatások hátterében. Nem mértük közvetlenül a CYP241 enzim aktivitását, mert ez technikailag túl komplikált lett volna a rendelkezésünkre álló infrastruktúra mellett. A CYP24A1 enzim termékeinek mérése is túl sok hibalehetőséget rejtett volna magában. Emiatt egy indirekt megközelítést választottunk: kimutattuk, hogy a vegyület jelenlétében a D-vitamin ismert antiproliferatív hatása jelenik meg, amelyet bizonyított a csökkent BrDU beépülés is. A citotoxikus hatást ki tudtuk zárni a sejtfelülúszó LDH meghatározásával, valamint kimutattuk, hogy a vegyület jelenlétében nem változik számottevően a VDR expressziója sem. Ugyan közvetlen bizonyítékot nem nyertünk a tényleges CYP24A1 inhibícióról, de más mechanizmus a fentiek tükrében nem valószínű.

A VDR receptor tumorokban két jelentős útvonalat mediál: a WNT-β-katenin és az E-kadherin útvonalat. A WNT- β-katenin útvonal az adherens sejt fenotípus elvesztésében játszik szerepet, míg az E-kadherin útvonal a sejt differenciálódásában fontos. (46, 74) A D-vitamin elnyomja a β-katenin útvonalat, és emeli az E-kadherin expressziót. A WNT-β-katenin útvonal konstitutívan túlexpresszált számos CRC daganattípusban az útvonal fehérjéinek (APC, AXIN2) mutációi miatt.(75) A CRC daganatok patogenezisében szerepet játszó számos faktor ezeken a pontokon hat a sejtekre: az ösztrogén receptorok például emelik a VDR szintet az emésztőszervek mucosájában, vagy a SNAIL fehérje, amely mind a VDR, mind az E-kadherin szintjét csökkenti. (44-46, 76-80) Ezek mellett

szintén fontos a malignus elfajulásban a CYP24A1 fehérje: a fehérje szintje korrelációt mutat a daganat agresszivitásával. (81)

A mi eredményeink megerősítik azokat a korábbi vizsgálatokat, melyek szerint a D-vitamin drámaian emeli a CYP24A1 enzim expresszióját CRC sejtekben. (82) A CYP24A1 enzim génjének promoter régiójában két VDR is elhelyezkedik. (83, 84) Egészséges szövetekben ez a negatív feedback mechanizmus akadályozza meg a D-vitamin szint emelkedését.

A genomi hatások mellett leírtak azonnali D-vitamin választ is tumoros sejtekben. Ezek egyike a RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK jelátviteli útvonal. Ez az útvonal a CST5 indukció útján hat, a CST5 fehérje pedig a tumorszuppresszióért felelős. A tumorsejtek felszínén található D-vitamin receptorok azonnali Ca2+ influxot generálnak, ami aktiválja a RhoA-ROCK komplexet, majd a p38-MAPK-MSK-1 útvonalat. (74) Az útvonal nem genomi aktiválásán kívül a RhoA gén promoter régiójában is azonosítható VDRE. A RhoA fehérje fontos szerepet jászik az E-kadherin útvonal aktiválásában, ezen keresztül a polarizált, adhezív sejtstruktúra kialakításában. (75)

Eredményeink birtokában elmondható, hogy a tetralon származékok új támadáspontot jelenthetnek a CRC elleni küzdelemben, a szelektív, lokális CYP24A1 gátlás pedig in vivo lehetőséget nyújt a D-vitamin tumorellenes hatásának fokozására a szisztémás hypercalcaemiát okozó mellékhatások megjelenése nélkül. (82)

5.2. A D-vitamin és a WNT útvonal kapcsolata a csontanyagcserében

Vizsgálatunkban a WNT útvonal kandidáns génjeinek polimorfizmusai és a csontdenzitás/csonttörés közti összefüggéseket vizsgáltuk. Szignifikáns kapcsolatot tudtunk kimutatni az LRP5 gén rs4988300 polimorfizmusa és a teljes csípő csontsűrűség között az eddig vizsgált legnagyobb homogén posztmenopauzás betegcsoportban.

Az LRP5 gén a WNT útvonal egyik koreceptora. GWAS vizsgálatok a gén számos lókuszát hozták összefüggésbe a csontritkulással. (85) A gén funkcióvesztő mutációi osteoporosis-pseudoglioma szindrómát okoznak, míg a funkciószerző mutációk esetén magas csonttömeget látunk. (86-88) A csonttörések, a csontdenzítás és az LRP5 gén polimorfizmusai között erős összefüggéseket írtak le. (89-93) Xiong és mtsai. 4 gént

találtak, amely a gerinc BMD-vel szoros összefüggést mutatott (LRP5, DBP, CYP17, RANK). Vizsgálatuk alapján az rs4988300 polimorfizmus és az rs 634008 polimorfizmus befolyásolta az alanyok gerinc ill. disztális radius csontritkulását, azonban a többszörös tesztelés korrigálása után az eredmények nem mutatkoztak statisztikalag szignfikánsnak. (94) A mi vizsgálataink során az s4988300 polimorfizmus Bonferroni korrekciót követően is statisztikai szignifikanciát mutatott a teljes csípő BMD-vel. ami megerősíti Kiel és mtsai. kutatási eredményeit. (95) Az általunk vizsgált kohorsz posztmenopauzás nők tekintetében nagyobb volt, mint a Kiel által vizsgált populáció, míg ők 646 posztmenopauzás nőt vizsgáltak, addig mi 889 alanyról gyűjtöttünk információt. Kiel és mtsai. kimutatták, hogy férfiakban a rs4988300 polimorfizmus összefüggést mutat a femur test keresztmetszetével is. Mivel a vizsgálati alanyok egy alcsoportjánál részletes törési anamnézissel is rendelkeztünk, megnéztük, hogy a polimorfizmus mutat-e összefüggést a csonttörések gyakoriságával. Méréseink alapján nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a csonttörések és az rs4988300 genotípusok között. Erre magyarázat lehet az, hogy a törések hátterében más tényezők is szerepet játszanak a BMD-n kívül, mint például a csont mikroarchitektúra vagy a kortikális csontvastagság. (96)

Nem találtunk bizonyítékot arra, hogy az SP7 vagy a GPR177 gén szignifikáns szerepet játszana a posztmenopauzás nők csonttömegében. A GPR177 fehérje egy glikoprotein, amely a WNT fehérjék Golgi exkréciójában vesz részt. (97) Rágcsálókban a fehérje a teljes élet során expresszálódik, jelenléte elengedhetetlen a megfelelő szervfejlődéshez, emellett szükség van rá a megfelelő antero-posterior fejlődéshez is. (98) Fu és mtsai. szerint a GPR177 és a WNT fehérjék között egy reciprok kölcsönhatás áll fenn. A GPR177 szintje WNT fehérjék hatására emelkedik, hiszen a GPR177 a WNT fehérjék egyik célpontja, ez pedig, a WNT fehérjék fokozott Golgi-exkréciója miatt, a WNT fehérjék szintjének további emelkedésével jár. (99) Kumar és mtsai nem tudtak összefüggést kimutatni a BMD és az általuk vizsgált GPR177 SNP-k között (rs983034, rs3748705, rs2566755, rs2820475) fiatal nőkben. (100) Az rs983034 és az rs2566755 SNP-k a mi vizsgálatunkban sem bizonyultak szignifikáns tényezőnek a BMD tekintetében. Roshandel és mtsai. 2359 férfi alanyban vizsgálták a gerinc BMD és a GPR177 kapcsolatát (European Male Ageing Study (EMAS)). Úgy találták, hogy az rs1430742 SNP szignifikáns összefüggést mutat a vizsgált fenotípussal. (101) A mi

eredményeink ezt nem erősítették meg, amire magyarázat lehet, hogy a két vizsgálat különböző nemű alanyok bevonásával történt. Az általunk vizsgált SNP-k közül az rs983034 és az rs3748704 is misszenz variációt kódol, azonban nem tudtuk bizonyítani kapcsolatukat posztmenopauzás nők BMD-jével. Annak ellenére, hogy GWAS vizsgálatok felvetették az rs2566755 és az rs1430742 SNP-k szerepét a BMD varianciájában, mi ezt nem tudtuk kimutatni.

Az SP7 fehérje egy jól ismert faktor a csontfejlődésben és az embriogenezisben. (102) Oszteoporózisban szenvedő emberek keringő mesenchymalis őssejtjeiben szignifikánsan alacsonyabb az SP7 expresszió, mint az egészséges emberekben. (103) Azonban olyan vizsgálat is ismert az irodalomban, ami a gén polimorfizmusai és a csonttömeg között nem talált összefüggést. (104) A mi vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a vizsgált SNP-k és a csonttömeg között. Az rs191240606 polimorfizmus monomorf SNP-nek adódott, annak ellenére, hogy az 1000 genom projekt adatbázisban a polimorfizmus nem monomorf. Ez a jelenség talán azzal magyarázható, hogy az 1000 genom projektben a kaukázusi népcsoportot a CEU populáció (USA állampolgárok észak- és nyugat-európai ősökkel) fedi le, ami nem biztos, hogy teljes mértékben egyezik a kelet-európai populációval.

6. Következtetések

Vizsgálatainak alapján látható, hogy a D-vitamin útvonalban szereplő CYP24A1 enzim nagyon fontos szerepet játszik a daganatok patogenezisében. Az irodalomban számos cikket találhatunk, melyben sorra bizonyítják, hogy az alacsony D-vitamin szint szerepet játszik tüdő-, prosztata-, pajzsmirigy-, gyomor-, illetve vastagbél daganatok kialakulásában. Normális D-vitamin szint esetén a tumorok képesek a daganatellenes hatást a vitamint inaktiváló CYP24A1 enzim fokozott termelése útján semlegesíteni.

Pajzsmirigy daganatokban kimutattuk, hogy a CYP24A1 mRNS szintje összefüggést mutat a daganatok invazivitásával, vaszkularizációjával, áttétképző tulajdonságával. CYP27B1 enzim esetében ezt az összefüggést nem tudtuk kimutatni. Ennek oka lehet, hogy a vesében megfelelő mennyiségű, aktív D-vitamin termelődik, ezért a daganatban az aktív D-vitamin szint nem tér el lényegesen az egészséges szövegekben mért intercelluláris D-vitamin szinttől. Azonban a CYP24A1 enzim segítségével a tumor sejt képes az intracellularis térben csökkenteni az aktív D-vitamin szintet, ezáltal akadályozva a vitamin receptorához való kötődést.

Ahogy a bevezetésében is láttuk, a D-vitamin jelátviteli útvonala és a WNT útvonal között szoros kapcsolat áll fenn a DKK fehérjén keresztül. Emiatt vizsgáltuk, hogy a D-vitamin szintje összefüggést mutat-e a WNT útvonalban fontos szerepet betöltő LRP5, gpr177 illetve sp7 gének polimorfizmusaival. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a fent említett gének SNP-i összefüggenek-e a vizsgálatba bevont posztmenopauzás nők csonttömegével illetve törlési kockázatával. Arra az eredményre jutottunk, hogy ezen fehérjék polimorfizmusai nem mutatnak szignifikáns összefüggést a D-vitamin szinttel. Azonban az LRP5 gén rs4988300 polimorfizmusa összefügg a betegek teljes csípő BMD-jével. Ismert, hogy ez a gén fontos szerepet tölt be a csontszövet remodellingjében. Az általunk vizsgált polimorfizmus heterozigóta hordozói szignifikánsan magasabb csont tömeggel rendelkeznek, mint a homozigóta variáns hordozói. Ennek egyik oka lehet, hogy az rs4988300 polimorfizmus nem felelős a biológiai hatásért, azt egy másik, vele egy haplotípus blokkban elhelyezkedő SNP hordozza. Ez az SNP hatását a splicing során az intron-exon határon elhelyezkedve a splicingot végző RNáz modulálása útján, splicing

variánsok kialakításával hajthatja végre. Ennek további vizsgálata, a pontos hatásmechanizmus megismerése további vizsgálatok tárgyát kell, hogy képezze.

Fentiek alapján nyilvánvaló, hogy az európai populációban igen elterjedt D-vitamin hiány nem csak az osteoporosis, hanem a daganatok előfordulási gyakoriságának növekedésében is szerepet játszhat. Továbbá a nemzetközi szakirodalomban leírták, hogy a D-vitamin szerepet játszik az obezítás, a cirkadián ritmus szabályozásában, a kardiovaszkuláris betegségek patogenezisében, illetve fontos immunmoduláló hatása van granulomatosus megbetegedésekben is. (10, 105-111) Ezért nagyon fontos, hogy az alapellátásban dolgozó orvosok is tisztában legyenek a D-vitamin pótlás szükségességével, illetve az arra vonatkozó legfrissebb nemzetközi ajánlásokkal.

7. Összefoglalás

A D-vitamin szerepe az emberi szervezetben messze túlmutat a csontanyagcserére gyakorolt hatásokon. Az endokrin hatásokon kívül jelentős szerepe van a szöveti mikrokörnyezet kialakításában, a sejtosztódás szabályozásában. Tumoros elfajulást mutató szövetekben a D-vitamin gátolja a sejtosztódást, es tumorellenes hatásokat fejt ki. Ez a hatás a tumorok széles körében kimutatható. Vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a D-vitamin inaktiválását végző CYP24A1 enzim fokozott expressziója összefüggést mutat a papilláris pajzsmirigy daganatok invazivításával, metasztázis képző tulajdonságukkal. (112) Az enzim expressziójának fokozása a tumorok részéről egy menekülési útvonalnak fogható fel. Colon tumoros sejtvonalon végzett vizsgálataink megmutatták, hogy ez a hatás újra megfigyelhető abban az esetben, ha a CYP24A1 enzimet gátoljuk működésében. Vizsgálatunk során bizonyítottuk, hogy az általunk szintetizált KD35 vegyület a CYP24A1 enzim gátlásán keresztül antiproliferatív hatást fejt ki, önmagában a sejtvonal sejtjeire nem toxikus, D-vitamin jelenlétében azonban koncentráció függően csökkenti az életképes tumorsejtek számát a sejtkultúrában. (113)

Az irodalomban leírt összefüggések alapján vizsgáltuk, hogy a D-vitamin szintje és a WNT útvonal fontos szereplői között találunk-e összefüggést posztmenopauzás nők csoportjában. Vizsgálataink alapján nincs statisztikailag szignifikáns összefüggés a D-vitamin szint, illetve a vizsgált polimorfizmusok között. Vizsgáltuk azt is, hogy ebben a kohorszban találunk-e összefüggést a vizsgált gének polimorfizmusai, illetve a betegek törési kockázata, csonttömege között. Azt találtuk, hogy az LRP5 gén rs4988300 polimorfizmusa statisztikailag szignifikáns összefüggést mutat a betegek teljes csípő BMD értékével. A többi polimorfizmus tekintetében nem találtunk ilyen összefüggést. (114)

A fentiek alapján összességében elmondható, hogy a szöveti mikrokörnyezet D-vitamin homeosztázisának felborulása változatos betegségekhez vezet, kardiovaszkuláris, immunológiai, endokrin, illetve onkológiai tekintetben is.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a D-vitamin általunk leírt sejtszintű hatásai új terápiás beavatkozások kifejlesztésének lehetőségét vetik fel.

8. Summary

The role of vitamin D in the human body is much more complex than the regulation of bone metabolism. Apart from the endocrinological features it is an important factor in tissue microenvironment. It is also a regulator of cell division. In cells that undergo malignant transformation vitamin D is an antiproliferative agent. This effect is present in many different tumors. We proved that the vitamin D inactivating CYP24A1 enzyme's over-expression is correlated with the invasiveness and metastizing capabilities of papillary thyroid tumors. (112) Increased expression of CYP24A1 is an escape mechanism from the vitamin's anti-tumor effects. Our studies performed on colon tumor cells showed that the anti-tumor effect can be observed after treatment with CYP24A1 inhibitors. We also proved that the compound KD35 synthetized by our group can effectively inhibit CYP24A1 enzyme, it is not cytotoxic, and it inhibits cell proliferation in a concentration dependent manner in the presence of vitamin D. (113)

Based on the proven correlation between the vitamin D and WNT pathways we measured whether we can find a connection between vitamin D levels and genetic polymorphisms of the key genes in the WNT pathway. There were no significant correlations between the vitamin D levels and the selected gene polymorphisms. We also tested for correlations between gene polymorphisms and bone parameters (fracture risk, BMD, T-score) in our cohort. SNP rs4988300 of LRP5 gene showed a statistically significant effect on total hip BMD of our patients. We did not find any effect of the other polymorphisms on bone parameters. (114)

Based on our results we can state that vitamin D is a very important regulator on a wide variety of cellular function. The imbalance of the tissue level vitamin D microenvironment leads to a variety of disease such as cardiovascular disease, immunologic and endocrine disorders, and neoplasms. It is of utmost importance to educate the population on the importance of vitamin D supplementation as modern day's people do not spend enough time outside to sustain adequate levels of vitamin D.

The new cellular level effects described by our study group open a possible opportunity for the development of new therapeutic agents.

9. Irodalomjegyzék

1. McLeod, D.S.A., A.M. Sawka, and D.S. Cooper (2013) Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer. The Lancet, 381(9871): 1046-1057.
2. Paterson, C.R. and D. Ayoub (2014) Congenital rickets due to vitamin D deficiency in the mothers. Clin Nutr.
3. Reid, I.R. (2015) What diseases are causally linked to vitamin D deficiency? Arch Dis Child.
4. Stamp, T.C. (1973) Vitamin D metabolism. Recent advances. Arch Dis Child, 48(1): 2-7.
5. Norman, A.W., R.L. Johnson, T.W. Osborn, D.A. Procsal, S.C. Carey, M.L. Hammond, M.N. Mitra, M.R. Pirio, A. Rego, R.M. Wing, and W.H. Okamura (1976) The chemistry and conformational and biological analysis of vitamin D3, its metabolites and analogues. Clin Endocrinol (Oxf), 5 Suppl: 121S-143S.
6. Ala-Houhala, M.J., K. Vahavihu, E. Snellman, T. Hasan, H. Kautiainen, P. Karisola, Y. Dombrowski, J. Schauber, H. Saha, and T. Reunala (2013) A narrow-band ultraviolet B course improves vitamin D balance and alters cutaneous CYP27A1 and CYP27B1 mRNA expression levels in haemodialysis patients supplemented with oral vitamin D. Nephron Clin Pract, 124(1-2): 17-22.
7. Gupta, R.P., K. Patrick, and N.H. Bell (2007) Mutational analysis of CYP27A1: assessment of 27-hydroxylation of cholesterol and 25-hydroxylation of vitamin D. Metabolism, 56(9): 1248-55.
8. Hosseinpour, F., I. Ibranovic, W. Tang, and K. Wikvall (2003) 25-Hydroxylation of vitamin D3 in primary cultures of pig hepatocytes: evidence for a role of both CYP2D25 and CYP27A1. Biochem Biophys Res Commun, 303(3): 877-83.
9. Tang, E.K., J. Chen, Z. Janjetovic, E.W. Tieu, A.T. Slominski, W. Li, and R.C. Tuckey (2013) Hydroxylation of CYP11A1-derived products of vitamin D3 metabolism by human and mouse CYP27B1. Drug Metab Dispos, 41(5): 1112-24.

10. Adams, J.S., B. Rafison, S. Witzel, R.E. Reyes, A. Shieh, R. Chun, K. Zavala, M. Hewison, and P.T. Liu (2014) Regulation of the extrarenal CYP27B1-hydroxylase. J Steroid Biochem Mol Biol, 144 Pt A: 22-7.
11. Wu, S., S. Ren, L. Nguyen, J.S. Adams, and M. Hewison (2007) Splice variants of the CYP27b1 gene and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production. Endocrinology, 148(7): 3410-8.
12. Tieu, E.W., E.K. Tang, J. Chen, W. Li, M.N. Nguyen, Z. Janjetovic, A. Slominski, and R.C. Tuckey (2012) Rat CYP24A1 acts on 20-hydroxyvitamin D(3) producing hydroxylated products with increased biological activity. Biochem Pharmacol, 84(12): 1696-704.
13. Tieu, E.W., E.K. Tang, and R.C. Tuckey (2014) Kinetic analysis of human CYP24A1 metabolism of vitamin D via the C24-oxidation pathway. Febs j, 281(14): 3280-96.
14. Zhou, Y., L.J. Zhao, X. Xu, A. Ye, D. Travers-Gustafson, B. Zhou, H.W. Wang, W. Zhang, L. Lee Hamm, H.W. Deng, R.R. Recker, and J.M. Lappe (2014) DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation. J Steroid Biochem Mol Biol, 144 Pt A: 207-14.
15. Fu, G.K., D. Lin, M.Y. Zhang, D.D. Bikle, C.H. Shackleton, W.L. Miller, and A.A. Portale (1997) Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. Mol Endocrinol, 11(13): 1961-70.
16. Fu, G.K., A.A. Portale, and W.L. Miller (1997) Complete structure of the human gene for the vitamin D 1alpha-hydroxylase, P450c1alpha. DNA Cell Biol, 16(12): 1499-507.
17. Takeyama, K. and S. Kato (2011) The vitamin D3 1alpha-hydroxylase gene and its regulation by active vitamin D3. Biosci Biotechnol Biochem, 75(2): 208-13.
18. Takeyama, K., S. Kitanaka, T. Sato, M. Kobori, J. Yanagisawa, and S. Kato (1997) 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. Science, 277(5333): 1827-30.
19. Kong, X.F., X.H. Zhu, Y.L. Pei, D.M. Jackson, and M.F. Holick (1999) Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(12): 6988-93.

20. Glorieux, F.H., A. Arabian, and E.E. Delvin (1995) Pseudo-vitamin D deficiency: absence of 25-hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase activity in human placenta decidual cells. J Clin Endocrinol Metab, 80(7): 2255-8.
21. Brozyna, A.A., W. Jozwicki, C. Jochymski, and A.T. Slominski (2015) Decreased expression of CYP27B1 correlates with the increased aggressiveness of ovarian carcinomas. Oncol Rep, 33(2): 599-606.
22. Banks, M. and M.F. Holick (2015) Molecular Mechanism(s) Involved in 25-Hydroxyvitamin D's Antiproliferative Effects in CYP27B1-transfected LNCaP Cells. Anticancer Res, 35(7): 3773-9.
23. Horvath, H.C., Z. Khabir, T. Nittke, S. Gruber, G. Speer, T. Manhardt, E. Bonner, and E. Kallay (2010) CYP24A1 splice variants--implications for the antitumorigenic actions of 1,25-(OH)2D3 in colorectal cancer. J Steroid Biochem Mol Biol, 121(1-2): 76-9.
24. Horvath, H.C., P. Lakatos, J.P. Kosa, K. Bacsi, K. Borka, G. Bises, T. Nittke, P.A. Hershberger, G. Speer, and E. Kallay The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis. J Histochem Cytochem, 58(3): 277-85.
25. Vashi, P.G., K. Trukova, C.A. Lammersfeld, D.P. Braun, and D. Gupta (2010) Impact of oral vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D levels in oncology. Nutr J, 9: 60.
26. Gregory, K.J., B. Zhao, D.R. Bielenberg, S. Dridi, J. Wu, W. Jiang, B. Huang, S. Pirie-Shepherd, and M. Fannon (2010) Vitamin D binding protein-macrophage activating factor directly inhibits proliferation, migration, and uPAR expression of prostate cancer cells. PLoS One, 5(10): e13428.
27. Krishnan, A.V. and D. Feldman (2010) Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment. Endocr Relat Cancer, 17(1): R19-38.
28. Montironi, R., D. Thompson, M. Scarpelli, R. Mazzucchelli, P. Peketi, P.W. Hamilton, D.G. Bostwick, and P.H. Bartels (2004) Karyometry detects subvisual differences in chromatin organization state between cribriform and flat high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. Mod Pathol, 17(8): 928-37.

29. Yan, M., R.M. Rerko, P. Platzer, D. Dawson, J. Willis, M. Tong, E. Lawrence, J. Lutterbaugh, S. Lu, J.K. Willson, G. Luo, J. Hensold, H.H. Tai, K. Wilson, and S.D. Markowitz (2004) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(50): 17468-73.
30. Moreno, J., A.V. Krishnan, S. Swami, L. Nonn, D.M. Peehl, and D. Feldman (2005) Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. Cancer Res, 65(17): 7917-25.
31. Nonn, L., L. Peng, D. Feldman, and D.M. Peehl (2006) Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. Cancer Res, 66(8): 4516-24.
32. Thompson, T., M. Danilenko, L. Vassilev, and G.P. Studzinski (2010) Tumor suppressor p53 status does not determine the differentiation-associated G cell cycle arrest induced in leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D and antioxidants. Cancer Biol Ther, 10(4): 344-50.
33. Axanova, L.S., Y.Q. Chen, T. McCoy, G. Sui, and S.D. Cramer (2010) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and PI3K/AKT inhibitors synergistically inhibit growth and induce senescence in prostate cancer cells. Prostate, 70(15): 1658-71.
34. Ben-Shoshan, M., S. Amir, D.T. Dang, L.H. Dang, Y. Weisman, and N.J. Mabjeesh (2007) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. Mol Cancer Ther, 6(4): 1433-9.
35. Bernardi, R.J., C.S. Johnson, R.A. Modzelewski, and D.L. Trump (2002) Antiproliferative effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. Endocrinology, 143(7): 2508-14.
36. Bao, B.Y., S.D. Yeh, and Y.F. Lee (2006) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. Carcinogenesis, 27(1): 32-42.
37. Ferlay, J., D.M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer, 46(4): 765-81.

38. Althuis, M.D., J.H. Fergenbaum, M. Garcia-Closas, L.A. Brinton, M.P. Madigan, and M.E. Sherman (2004) Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 13(10): 1558-68.
39. Giovannucci, E. (2008) Vitamin D status and cancer incidence and mortality. Adv Exp Med Biol, 624: 31-42.
40. Krishnan, A.V., S. Swami, and D. Feldman (2010) Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling. J Steroid Biochem Mol Biol, 121(1-2): 343-8.
41. Simpson, E.R., C. Clyne, G. Rubin, W.C. Boon, K. Robertson, K. Britt, C. Speed, and M. Jones (2002) Aromatase--a brief overview. Annu Rev Physiol, 64: 93-127.
42. Stoica, A., M. Saceda, A. Fakhro, H.B. Solomon, B.D. Fenster, and M.B. Martin (1999) Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. J Cell Biochem, 75(4): 640-51.
43. Vink-van Wijngaarden, T., H.A. Pols, C.J. Buurman, G.J. van den Bemd, L.C. Dorssers, J.C. Birkenhager, and J.P. van Leeuwen (1994) Inhibition of breast cancer cell growth by combined treatment with vitamin D3 analogues and tamoxifen. Cancer Res, 54(21): 5711-7.
44. Palmer, H.G., M.J. Larriba, J.M. Garcia, P. Ordonez-Moran, C. Pena, S. Peiro, I. Puig, R. Rodriguez, R. de la Fuente, A. Bernad, M. Pollan, F. Bonilla, C. Gamallo, A.G. de Herreros, and A. Munoz (2004) The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. Nat Med, 10(9): 917-9.
45. Larriba, M.J. and A. Munoz (2005) SNAIL vs vitamin D receptor expression in colon cancer: therapeutics implications. Br J Cancer, 92(6): 985-9.
46. Pena, C., J.M. Garcia, J. Silva, V. Garcia, R. Rodriguez, I. Alonso, I. Millan, C. Salas, A.G. de Herreros, A. Munoz, and F. Bonilla (2005) E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. Hum Mol Genet, 14(22): 3361-70.
47. Pendas-Franco, N., O. Aguilera, F. Pereira, J.M. Gonzalez-Sancho, and A. Munoz (2008) Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. Anticancer Res, 28(5A): 2613-23.

48. Zheng, W., K.E. Wong, Z. Zhang, U. Dougherty, R. Mustafi, J. Kong, D.K. Deb, H. Zheng, M. Bissonnette, and Y.C. Li (2011) Inactivation of the vitamin D receptor in APC(min/+) mice reveals a critical role for the vitamin D receptor in intestinal tumor growth. Int J Cancer.
49. Bikle, D.D. (2011) Vitamin D: an ancient hormone. Exp Dermatol, 20(1): 7-13.
50. Bareis, P., E. Kallay, M.G. Bischof, G. Bises, H. Hofer, C. Potzi, T. Manhardt, R. Bland, and H.S. Cross (2002) Clonal differences in expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase, of 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase, and of the vitamin D receptor in human colon carcinoma cells: effects of epidermal growth factor and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). Exp Cell Res, 276(2): 320-7.
51. Speer, G. (2010) [The role of vitamin D in the prevention and the additional therapy of cancers.]. Magy Onkol, 54(4): 303-314.
52. Sharma, V., D. Fretwell, Z. Crees, A. Kerege, and J.P. Klopper (2010) Thyroid cancer resistance to vitamin D receptor activation is associated with 24-hydroxylase levels but not the ff FokI polymorphism. Thyroid, 20(10): 1103-11.
53. Goldner, W., N. Laney, J. Meza, E. Lyden, J. Erickson, and K. Treude (2010) The prevalence of vitamin D deficiency is similar between thyroid nodule and thyroid cancer patients. International Journal of Endocrinology, 2010.
54. Stepien, T., R. Krupinski, J. Sopinski, K. Kuzdak, J. Komorowski, H. Lawnicka, and H. Stepien (2010) Decreased 1-25 Dihydroxyvitamin D 3 Concentration in Peripheral Blood Serum of Patients with Thyroid Cancer. Archives of Medical Research, 41(3): 190-194.
55. Clinckspoor, I., E. Hauben, L. Verlinden, A. van den Bruel, L. Vanwalleghem, V. Vander Poorten, P. Delaere, C. Mathieu, A. Verstuyf, and B. Decallonne (2012) Altered Expression of Key Players in Vitamin D Metabolism and Signaling in Malignant and Benign Thyroid Tumors. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 60(7): 502-511.
56. Adeniran, A.J., Z. Zhu, M. Gandhi, D.L. Steward, J.P. Fidler, T.J. Giordano, P.W. Biddinger, and Y.E. Nikiforov (2006) Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of

thyroid papillary carcinomas. American Journal of Surgical Pathology, 30(2): 216-222.

57. Kimura, E.T., M.N. Nikiforova, Z. Zhu, J.A. Knauf, Y.E. Nikiforov, and J.A. Fagin (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: Genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Research, 63(7): 1454-1457.
58. Xing, M. (2007) BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocrine Reviews, 28(7): 742-762.
59. Paulson, L., M. Shindo, K. Schuff, and C. Corless (2012) The role of molecular markers and tumor histological type in central lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma. Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 138(1): 44-49.
60. Basolo, F., L. Torregrossa, R. Giannini, M. Miccoli, C. Lupi, E. Sensi, P. Berti, R. Elisei, P. Vitti, A. Baggiani, and P. Miccoli (2010) Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: Analysis of 1060 cases. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 95(9): 4197-4205.
61. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova (2011) Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nature Reviews Endocrinology, 7(10): 569-580.
62. Aboraia, A.S., B. Makowski, A. Bahja, D. Prosser, A. Brancale, G. Jones, and C. Simons (2010) Synthesis and CYP24A1 inhibitory activity of (E)-2-(2-substituted benzylidene)- and 2-(2-substituted benzyl)-6-methoxy-tetralones. Eur J Med Chem, 45(10): 4427-34.
63. Ivanyi, Z., J. Wolfling, T. Gorbe, M. Szecsi, T. Wittmann, and G. Schneider (2010) Synthesis of regioisomeric 17beta-N-phenylpyrazolyl steroid derivatives and their inhibitory effect on 17alpha-hydroxylase/C(17,20)-lyase. Steroids, 75(6): 450-6.
64. Wolfling, J., E.A. Oravecz, D. Ondre, E. Mernyak, G. Schneider, I. Toth, M. Szecsi, and J. Julesz (2006) Stereoselective synthesis of some 17beta-dihydrooxazinyl steroids, as novel presumed inhibitors of 17alpha-hydroxylase-C17,20-lyase. Steroids, 71(9): 809-16.

65. Yee, S.W., L. Jarno, M.S. Gomaa, C. Elford, L.L. Ooi, M.P. Coogan, R. McClelland, R.I. Nicholson, B.A. Evans, A. Brancale, and C. Simons (2005) Novel tetralone-derived retinoic acid metabolism blocking agents: synthesis and in vitro evaluation with liver microsomal and MCF-7 CYP26A1 cell assays. J Med Chem, 48(23): 7123-31.

66. Gonzalez, J.R., L. Armengol, X. Sole, E. Guino, J.M. Mercader, X. Estivill, and V. Moreno (2007) SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. Bioinformatics, 23(5): 644-645.

67. Pellegriti, G., F. Frasca, C. Regalbuto, S. Squatrito, and R. Vigneri (2013) Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. J Cancer Epidemiol, 2013: 965212.

68. Albores-Saavedra, J., D.E. Henson, E. Glazer, and A.M. Schwartz (2007) Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. Endocr Pathol, 18(1): 1-7.

69. Clinckspoor, I., L. Verlinden, C. Mathieu, R. Bouillon, A. Verstuyf, and B. Decallonne (2013) Vitamin D in thyroid tumorigenesis and development. Prog Histochem Cytochem, 48(2): 65-98.

70. Clinckspoor, I., E. Hauben, L. Verlinden, A. Van den Bruel, L. Vanwalleghem, V. Vander Poorten, P. Delaere, C. Mathieu, A. Verstuyf, and B. Decallonne (2012) Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors. J Histochem Cytochem, 60(7): 502-11.

71. Carpi, A., J.I. Mechanick, S. Saussez, and A. Nicolini (2010) Thyroid tumor marker genomics and proteomics: diagnostic and clinical implications. J Cell Physiol, 224(3): 612-9.

72. Khadzkou, K., P. Buchwald, G. Westin, H. Dralle, G. Akerstrom, and P. Hellman (2006) 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma. J Histochem Cytochem, 54(3): 355-61.

73. Schuster, I., H. Egger, P. Nussbaumer, and R.T. Kroemer (2003) Inhibitors of vitamin D hydroxylases: structure-activity relationships. J Cell Biochem, 88(2): 372-80.

74. Ordonez-Moran, P., S. Alvarez-Diaz, N. Valle, M.J. Larriba, F. Bonilla, and A. Munoz (2010) The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on colon cancer cells depend on RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK signaling. J Steroid Biochem Mol Biol, 121(1-2): 355-61.

75. Ordonez-Moran, P., M.J. Larriba, H.G. Palmer, R.A. Valero, A. Barbachano, M. Dunach, A.G. de Herreros, C. Villalobos, M.T. Berciano, M. Lafarga, and A. Munoz (2008) RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. J Cell Biol, 183(4): 697-710.

76. Gilad, L.A., T. Bresler, J. Gnainsky, P. Smirnoff, and B. Schwartz (2005) Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. J Endocrinol, 185(3): 577-92.

77. Gilad, L.A., O. Tirosh, and B. Schwartz (2006) Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. J Endocrinol, 191(2): 387-98.

78. Lechner, D., E. Bajna, H. Adlercreutz, and H.S. Cross (2006) Genistein and 17beta-estradiol, but not equol, regulate vitamin D synthesis in human colon and breast cancer cells. Anticancer Res, 26(4A): 2597-603.

79. Larriba, M.J., F. Bonilla, and A. Munoz (2010) The transcription factors Snail1 and Snail2 repress vitamin D receptor during colon cancer progression. J Steroid Biochem Mol Biol, 121(1-2): 106-9.

80. Larriba, M.J., P. Ordonez-Moran, I. Chicote, G. Martin-Fernandez, I. Puig, A. Munoz, and H.G. Palmer (2011) Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/beta-catenin signaling and tumor burden in colon cancer. PLoS One, 6(8): e23524.

81. Horvath, E., P. Lakatos, B. Balla, J.P. Kosa, B. Tobias, H. Jozilan, K. Borka, H.C. Horvath, I. Kovalszky, and F. Szalay (2012) Marked increase of CYP24A1 mRNA level in hepatocellular carcinoma cell lines following vitamin D administration. Anticancer Res, 32(11): 4791-6.

82. Tashiro, K., T. Abe, N. Oue, W. Yasui, and M. Ryoji (2004) Characterization of vitamin D-mediated induction of the CYP 24 transcription. Mol Cell Endocrinol, 226(1-2): 27-32.

83. Chen, K.S. and H.F. DeLuca (1995) Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. Biochim Biophys Acta, 1263(1): 1-9.

84. Meyer, M.B., P.D. Goetsch, and J.W. Pike (2010) A Downstream Intergenic Cluster of Regulatory Enhancers Contributes to the Induction of CYP24A1 Expression by 1α,25-Dihydroxyvitamin D(3). J Biol Chem, 285(20): 15599-610.

85. Riancho, J.A., J.M. Olmos, B. Pineda, C. Garcia-Ibarbia, M.I. Perez-Nunez, D.N. Nan, J. Velasco, A. Cano, M.A. Garcia-Perez, M.T. Zarrabeitia, and J. Gonzalez-Macias (2011) Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. Eur J Endocrinol, 164(1): 123-31.

86. Tuysuz, B., A. Bursali, Z. Alp, N. Suyugul, C.M. Laine, and O. Makitie (2012) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: three novel mutations in the LRP5 gene and response to bisphosphonate treatment. Horm Res Paediatr, 77(2): 115-20.

87. Laine, C.M., B.D. Chung, M. Susic, T. Prescott, O. Semler, T. Fiskerstrand, P. D'Eufemia, M. Castori, M. Pekkinen, E. Sochett, W.G. Cole, C. Netzer, and O. Makitie (2011) Novel mutations affecting LRP5 splicing in patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG). Eur J Hum Genet, 19(8): 875-81.

88. Boyden, L.M., J. Mao, J. Belsky, L. Mitzner, A. Farhi, M.A. Mitnick, D. Wu, K. Insogna, and R.P. Lifton (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. New England Journal of Medicine, 346(20): 1513-1521.

89. Gong, Y., R.B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A.M. Reginato, H. Wang, T. Cundy, F.H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W.N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J.A. Batch, P. Beighton, G.C.M. Black, R.G. Boles, L.M. Boon, C. Borrone, H.G. Brunner, G.F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M.L. Halfhide, B. Hall, R.C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Jüppner, C.A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre, T.

Letteboer, L. Peltonen, R.S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M.J. Van den Boogaard, W. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B.R. Olsen, and M.L. Warman (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell, 107(4): 513-523.

90. He, X., M. Semenov, K. Tamai, and X. Zeng (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/β-catenin signaling: Arrows point the way. Development, 131(8): 1663-1677.

91. Yadav, V.K., J.H. Ryu, N. Suda, K.F. Tanaka, J.A. Gingrich, G. Schütz, F.H. Glorieux, C.Y. Chiang, J.D. Zajac, K.L. Insogna, J.J. Mann, R. Hen, P. Ducy, and G. Karsenty (2008) Lrp5 Controls Bone Formation by Inhibiting Serotonin Synthesis in the Duodenum. Cell, 135(5): 825-837.

92. Hill, T.P., D. Später, M.M. Taketo, W. Birchmeier, and C. Hartmann (2005) Canonical Wnt/β-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Developmental Cell, 8(5): 727-738.

93. Hu, H., M.J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D.M. Ornitz, and F. Long (2005) Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. Development, 132(1): 49-60.

94. Xiong, D.H., H. Shen, L.J. Zhao, P. Xiao, T.L. Yang, Y. Guo, W. Wang, Y.F. Guo, Y.J. Liu, R.R. Recker, and H.W. Deng (2006) Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. J Bone Miner Res, 21(11): 1678-95.

95. Kiel, D.P., S. Demissie, J. Dupuis, K.L. Lunetta, J.M. Murabito, and D. Karasik (2007) Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. BMC Med Genet, 8 Suppl 1: S14.

96. Cefalu, C.A. (2004) Is bone mineral density predictive of fracture risk reduction? Curr Med Res Opin, 20(3): 341-9.

97. Yu, H.M., Y. Jin, J. Fu, and W. Hsu (2010) Expression of Gpr177, a Wnt trafficking regulator, in mouse embryogenesis. Dev Dyn, 239(7): 2102-9.

98. Jin, J., M. Morse, C. Frey, J. Petko, and R. Levenson (2010) Expression of GPR177 (Wntless/Evi/Sprinter), a highly conserved Wnt-transport protein, in rat tissues, zebrafish embryos, and cultured human cells. Dev Dyn, 239(9): 2426-34.

99. Fu, J., M. Jiang, A.J. Mirando, H.M. Yu, and W. Hsu (2009) Reciprocal regulation of Wnt and Gpr177/mouse Wntless is required for embryonic axis formation. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(44): 18598-603.

100. Kumar, J., M. Swanberg, F. McGuigan, M. Callreus, P. Gerdhem, and K. Akesson (2011) LRP4 association to bone properties and fracture and interaction with genes in the Wnt- and BMP signaling pathways. Bone, 49(3): 343-8.

101. Roshandel, D., W. Thomson, S.R. Pye, S. Boonen, H. Borghs, D. Vanderschueren, I.T. Huhtaniemi, J.E. Adams, K.A. Ward, G. Bartfai, F.F. Casanueva, J.D. Finn, G. Forti, A. Giwercman, T.S. Han, K. Kula, M.E. Lean, N. Pendleton, M. Punab, F.C. Wu, K.L. Holliday, and T.W. O'Neill (2011) Polymorphisms in genes involved in the NF-kappaB signalling pathway are associated with bone mineral density, geometry and turnover in men. PLoS One, 6(11): e28031.

102. Chauveau, C., O. Broux, C. Delecourt, P. Hardouin, J. Jeanfils, and J.C. Devedjian (2008) Gene expression in normotopic and heterotopic human bone: increased level of SP7 mRNA in pathological tissue. Mol Cell Biochem, 318(1-2): 81-7.

103. Dalle Carbonare, L., M.T. Valenti, M. Zanatta, L. Donatelli, and V. Lo Cascio (2009) Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. Arthritis Rheum, 60(11): 3356-65.

104. Mendez, J.P., D. Rojano-Mejia, R.M. Coral-Vazquez, A. Coronel, J. Pedraza, M.J. Casas, R. Soriano, E. Garcia-Garcia, F. Vilchis, and P. Canto (2013) Impact of genetic variants of IL-6, IL6R, LRP5, ESR1 and SP7 genes on bone mineral density in postmenopausal Mexican-Mestizo women with obesity. Gene, 528(2): 216-20.

105. G, R. and A. Gupta (2014) Vitamin D deficiency in India: prevalence, causalities and interventions. Nutrients, 6(2): 729-75.

106. Abu el Maaty, M.A. and M.Z. Gad (2013) Vitamin D deficiency and cardiovascular disease: potential mechanisms and novel perspectives. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 59(6): 479-88.

107. Berridge, M.J. (2015) Vitamin D cell signalling in health and disease. Biochem Biophys Res Commun, 460(1): 53-71.

108. Kannan, S. and H.W. Lim (2014) Photoprotection and vitamin D: a review. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 30(2-3): 137-45.

109. Zittermann, A. (2014) Vitamin D and cardiovascular disease. Anticancer Res, 34(9): 4641-8.

110. Ma, N.S. and C.M. Gordon (2012) The truth about vitamin D and adolescent skeletal health. Adolesc Med State Art Rev, 23(3): 457-70.

111. Peterson, C.A. and A.M. Belenchia (2014) Vitamin D deficiency & childhood obesity: a tale of two epidemics. Mo Med, 111(1): 49-53.

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

113. Kósa, J.P., P. Horváth, J. Wölfing, D. Kovács, B. Balla, P. Mátyus, E. Horváth, G. Speer, I. Takács, Z. Nagy, H. Horváth, and P. Lakatos (2013) CYP24A1 inhibition facilitates the anti-tumor effect of vitamin D3 on colorectal cancer cells. World Journal of Gastroenterology, 19(17): 2621-2628.

114. Horvath, P., B. Balla, J.P. Kosa, B. Tobias, B. Szili, G. Kirschner, G. Gyori, K. Kato, P. Lakatos, and I. Takacs (2016) Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. J Bone Miner Metab, 34(1): 79-85.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. A disszertációval összefüggő saját közlemények listája

Kósa, J. P., P. Horváth, J. Wölfing, D. Kovács, B. Balla, P. Mátyus, E. Horváth, G. Speer, I. Takács, Z. Nagy, H. Horváth and P. Lakatos (2013). CYP24A1 inhibition facilitates the anti-tumor effect of vitamin D3 on colorectal cancer cells. World Journal of Gastroenterology 19(17): 2621-2628.

Horvath, P., B. Balla, J. P. Kosa, B. Tobias, B. Szili, G. Kirschner, G. Gyori, K. Kato, P. Lakatos and I. Takacs (2016). Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. J Bone Miner Metab 34(1): 79-85.

Balla, B., B. Tobias, J. P. Kosa, J. Podani, P. Horvath, Z. Nagy, J. Horanyi, B. Jaray, E. Szekely, L. Krenacs, K. Arvai, M. Dank, Z. Putz, B. Szabo, B. Szili, Z. Valkusz, B. Vasas, G. Gyori, P. Lakatos and I. Takacs (2014). Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer. J Endocrinol Invest. 38(3): 313-321.

10.2. A disszertációval nem összefüggő saját közlemények listája

Laszlo Kunos, Zsofia Lazar, Fruzsina Martinovszky, Adam D. Tarnoki, David L. Tarnoki, Daniel Kovacs, Bianka Forgo, Peter Horvath, Gyorgy Losonczy, Andras Bikov: *Overnight Changes in Lung Function of Obese Patients with Obstructive Sleep Apnoea*. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose 10/2016; DOI:10.1007/s00408-016-9957-1

Péter Horváth, Zsófia Lázár, Rita Puskás, Gabriella Gálffy, György Losonczy, László Kunos, András Bikov: *The role of the complement system in the pathomechanism of obstructive sleep apnea syndrome*. European Respiratory Journal 09/2016; 48(suppl 60). DOI:10.1183/13993003.congress-2016.PA2297

Zsófia Lázár, Péter Horváth, Rita Puskás, László Kunos, György Losonczy, Gabriella Gálffy, András Bikov: *Bronchial and alveolar nitric oxide levels in healthy volunteers and patients with severe asthma*. European Respiratory Journal 09/2016; 48(suppl 60). DOI:10.1183/13993003.congress-2016.PA1070

Gyöngyi Kirschner, Bernadett Balla, János Kósa, Péter Horváth, Andrea Kövesdi, Gergely Lakatos, István Takács, Zsolt Nagy, Bálint Tóbiás, Kristóf Árvai, Péter Lakatos: *Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozinkináz-gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények bemutatása*. Orvosi Hetilap 09/2016; 157(36). DOI:10.1556/650.2016.30525

Kristóf Árvai, Péter Horváth, Bernadett Balla, Bálint Tobiás, Karina Kató, Gyöngyi Kirschner, Valéria Klujber, Péter Lakatos, János P. Kósa: *Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice*. Scientific Reports 06/2016; 6. DOI:10.1038/srep28417

Dániel Németh, Kristóf Árvai, Péter Horváth, János Pál Kósa, Bálint Tobiás, Bernadett Balla, Anikó Folhoffer, Anna Krolopp, Péter András Lakatos, Ferenc Szalay: *Clinical Use of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Wilson's Disease*. Gastroenterology Research and Practice 01/2016; 2016(4). DOI:10.1155/2016/4548039

Bálint Tobiás, Csaba Halászlaki, Bernadett Balla, János P Kósa, Kristóf Árvai, Péter Horváth, István Takács, Zsolt Nagy, Evelin Horváth, János Horányi, Balázs Járay, Eszter Székely, Tamás Székely, Gabriella Győri, Zsuzsanna Putz, Magdolna Dank, Zsuzsanna Valkusz, Béla Vasas, Béla Iványi, Péter Lakatos: *Genetic Alterations in Hungarian Patients with Papillary Thyroid Cancer*. Pathology & Oncology Research 08/2015; 22(1). DOI:10.1007/s12253-015-9969-9

Balint Tobias, Bernadett Balla, P Janos Kosa, Istvan Takacs, Zsolt Nagy, Peter Horvath, Balazs Jaray, Eszter Szekely, Roland Istok, Tamas Szekely, Peter Lakatos: *Detection of somatic oncogene alterations in FNA samples of cold nodules and 3 years follow-up of patients in Hungary*. 05/2015; DOI:10.1530/endoabs.37.EP853

Bernadett Balla, Peter Horvath, Balint Tobias, Gabriella Gyori, Balazs Jaray, Janos Kosa, Peter Lakatos: *Vitamin-D neutralising CYP24A1 gene expression in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples*. 05/2015; DOI:10.1530/endoabs.37.EP855

H.N.A. Jozilan, P. Horvath, J.P. Kosa, P. Lakatos, D. Nemeth, J. Wölfling, D. Kovacs, B. Bodnar, P. Matyus, E. Horvath, I. Kovalszky, F. Szalay: *P0321: Increased anti-tumor effect of vitamin D after CYP24A1 inhibition on HCC cell lines*. Journal of Hepatology 04/2015; 62. DOI:10.1016/S0168-8278(15)30536-5

D. Németh, J. Pál Kósa, K. Árvai, P. Horváth, B. Tobiás, B. Balla, A. Folhoffer, A. Krolopp, P. András Lakatos, F. Szalay: *P1224: Next-generation sequencing for the diagnosis of wilson's disease*. Journal of Hepatology 04/2015; 62. DOI:10.1016/S0168-8278(15)31420-3

Kristóf Arvai, Péter Horváth, Bernadett Balla, Anna M Tőkés, Bálint Tobiás, István Takács, Zsolt Nagy, Péter Lakatos, János P Kósa: *Rapid and cost effective screening of breast and ovarian cancer genes using novel sequence capture method in clinical samples*. Familial Cancer 05/2014; 13(4). DOI:10.1007/s10689-014-9730-7

D Németh, A Folhoffer, A Krolopp, J Kósa, K Árvai, P Horváth, P Lakatos, Z Gerlei, L Kóbori, D Görög, M Szathmári, F Szalay: *New mutation of ATP7B gene detected by Ion Torrent in a Wilson patient with acute on chronic liver failure, transplanted via Eurotransplant*. Zeitschrift für Gastroenterologie 05/2014; 52(05). DOI:10.1055/s-0034-1376107

Bernadett Balla, Kristóf Arvai, Péter Horváth, Bálint Tobiás, István Takács, Zsolt Nagy, Magdolna Dank, György Fekete, János P Kósa, Péter Lakatos: *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 03/2014; 53(2). DOI:10.1007/s12031-014-0286-7

Balint Tobias, Bernadett Balla, Janos P Kosa, Janos Horanyi, Istvan Takacs, Zsolt Nagy, Peter Horvath, Balazs Jaray, Eszter Szekely, Roland Istok, Tamas Szekely, Peter Lakatos: *Detecting somatic oncogene mutations in FNA samples of cold nodules in Hungary*. 03/2013; DOI:10.1530/endoabs.32.P1108

Bernadett Balla, Janos Kosa, Balint Tobias, Istvan Takacs, Zsolt Nagy, Peter Horvath, Janos Horanyi, Eszter Szekely, Balazs Jaray, Peter Lakatos: *Examination of CYP24A1 and 'three-genes' (SFN, MRC2, HMGA2) expressions in different pathological subgroups of human papillary thyroid cancer*. 03/2013; DOI:10.1530/endoabs.32.P1098

P Horváth, JP Kósa, J Wölfling, B Balla, D Kovács, P Mátyus, E Horváth, G Speer, I Takács, Z Nagy, P Lakatos: *D-hormon és CYP24A1-gátlás: új megközelítés a colorectalis daganatok kezelésében*. Magyar Belorvosi Archivum 01/2011; 64(5).

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a felbecsülhetetlen segítséget és a türelmet, amit szüleimtől, Horváth Zoltántól és Horváthné Kiss Zsuzsannától kaptam a doktori képzés alatt. Köszönöm páromnak, Bóday Orgonának az elmúlt évek során nyújtott támogatást, hogy minden hullámvölgyön segített túllendülni. Nélkülük a jelen munka elkészítése lehetetlen lett volna. Köszönöm témavezetőmnek, Lakatos Péter professzor úrnak, hogy harmadéves medikus korom óta nem csak, mint témavezetőmre, de mint mentoromra is tekinthettem rá. Köszönöm dr. Kósa Jánosnak, dr. Balla Bernadettnek, dr. Tóbiás Bálintnak valamint Árvai Kristófnak, hogy a sikeres laboratóriumi munkához szükséges ismeretekre megtanítottak. Végül de nem utolsó sorban köszönöm a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató Laboratórium minden munkatársának az önzetlen segítőkészséget, amit az ott töltött hat esztendő során megtapasztaltam.