

Phaeochromocytómák és paragangliómák komplex genetikai és tumorbiológiai vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Sarkadi Balázs

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Czirják Gábor, PhD., egyetemi docens

Dr. Rubovszky Gábor, PhD., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Horváth Csaba, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Hubina Erika, PhD., főorvos

Dr. Beke Artúr, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

BEVEZETÉS

A phaeochromocytomák és paragangliómák (Phaeo/PGL) ritka, kromaffin sejt eredetű daganatok. Több, mint 40%-ban a tumor háttérében csírarsejtes mutáció áll az eddig leírt 17 Phaeo/PGL gén egyikében. A diverz genetikai háttér jelentős kihívás elé állítja mind a tumorbiológiai folyamatokat vizsgáló kutatót, illetve a terápiás és prognosztikai faktorokat vizsgáló klinikust. A ritkábban előforduló, de rendkívül agresszív fenotípussal társuló malignus Phaeo/PGL esetében specifikus prognosztikai faktor és terápiás ágens jelenleg nem áll rendelkezésre.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Genetikai vizsgálatok célkitűzései

Célul tűztük ki egy daganatos endokrin megbetegedésekre hajlamosító géneket lefedő új generációs szekvenálási panel kifejlesztését és klinikai alkalmazhatóságának vizsgálatát. Egy unikális eset bemutatásán keresztül két, különböző betegséghez társuló csírarsejtes mutáció együttes fennállásának fenotípust módosító hatásainak elemzését, abból a célból, hogy a különböző patogenetikai hatások, milyen hatással lehetnek egymásra.

2. Tumorbiológiai vizsgálatok

Célunk volt új prognosztikus és terápiás markerek azonosítása malignus Phaeo/PGL tumorok esetében. Kutatásaink tárgyát képezte az *SDHB* mutáció talaján kialakuló, malignus Phaeo/PGL daganatok modellezésére alkalmas *in vitro* módszer kifejlesztése és jellemzése.

MÓDSZEREK

1. Phaeo/PGL betegek genetikai vizsgálata DNS szekvenálással

Az Endogén Panel validációs csoportjába tartozó betegek *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX* és *TMEM127* génjeit a panelszekvenálás előtt, illetve az esettanulmányunkban szűrt *RET*, *BRCA1* és *BRCA2* géneket tájékoztatott beleegyezést és beleegyező nyilatkozatok aláírását követően hagyományos PCR reakciókkal és Sanger szekvenálással vizsgáltuk. DNS kivonást a vérből kereskedelmi forgalomban elérhető kitekkel végeztük (Roche High Pure kit, Roche és QIAamp DNA Mini kit, Qiagen). Vizsgálatainkat az ETT-TUKEB engedélyezte (ETT-TUKEB 4457/2012/EKU).

2. Az Endogén Panel összeállítása

Az Endogén Panel első verziójában az *EGLN1*, *EPAS1*, *FH*, *KIF1B*, *MEN1*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127*, *VHL* géneket vizsgáltuk. A második verzióban a gének listáját az újabb irodalmi adatoknak megfelelően bővítettük a *GOT2*, *MAX*, *MDH2*, *SDHAF2* és *SLC25A11* génekkel. A célzott génpanel könyvtárkészítésében Roche NimbleGene SeqCap technológiát használtunk. Ez a technológia hibridizáción alapul, ami a PCR alapú technológiákhoz képest specifikusabb könyvtárkészítést tesz lehetővé. Minden gén minden kódoló exonjára terveztünk próbákat, a teljes genetikai régió > 98%-át sikerült lefedni. Az exonok mellett a splice régiók 30 nukleotid hosszúságú szakaszai is vizsgálhatók voltak a tervezett próbákkal.

A szekvenálás az Endogén Panel 1.0 verziója esetén MiSeq Reagent Kit, micro formatot, míg az Endogén Panel 2.0 esetén a MiSeq Reagent Kit, nano formatját használtuk (Illumina). A szekvenálást Illumina MiSeq készüléken végeztük (Illumina).

3. Variánsok azonosítása a panelszekvenálás során

A szekvenálás közben kapott genom adatok vizsgálata GATK (Genome Analysis Toolkit) Best Practices használatával történt. Az adapter szekvenciákat eltávolítottuk Cutadapt segítségével. A nyers szekvenálási, FASTQ formátumban kapott readeket az UCSC hg19 humán referencia genomhoz illesztettük Burrows-Wheeler Aligner algoritmus használatával. Samtools használatával eltávolítottuk a 20-nál kisebb quality score-ral rendelkező readeket. A PCR duplikátumok szűrésére Picard MarkDuplicates programot használtunk. Az ún. indel újraillesztést és a bázis quality score újrakalibrálását GATK alkalmazásával végeztük. A variánsok funkcionális karakterizálására interneten elérhető, SNPEFFECT, SIFT, ClinVar, Varsome és PolyPhen alkalmazásokat használtunk. Az ENDOGEN 2 panel eredményeit a GATK FUNCTATOR algoritmusával is elemeztük.

A variánsok prevalenciáját és klinikai jelentőségét a dbSNP, az amerikai Exom Project Variant szervere (National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project Exome Variant Server), Hapmap, ClinVar, Varsome és 1000Genomes adatbázisai segítségével határoztuk meg.

Az azonosított összes variáns ugyanazon a szűrési folyamaton esett át, mely során elimináltuk az exonon kívüli (UTR), a szinoním és alacsony read-számú (<10 read/variáns) eltéréseket.

4. Sejttenyészetek

Valamennyi sejtvonalat az American Type Culture Collection (ATCC) cégtől vásároltuk. A sejtek tenyésztése a gyártó ajánlás szerint történt. PC12 (patkány kromaffin sejtvonala), HeLa (humán méhnyakrák sejtvonala) és H295R (humán mellékvesekéreg daganat sejtvonala) sejteket használtunk. Hagyományos 2D és a PC12 esetében szferoid képződésen alapuló 3D sejttenyésztést is létrehoztunk.

5. *Sdhb* csendesítés

A PC12 sejteket 6-lyukú plate-ekre ültettük ki 24 órával a transzfekciót megelőzően, antibiotikummentes tápban. Két Silencer Select kis interferáló, *Sdhb* gént célzó RNS-t (siRNS 1: Sequence (5'→3': GAUUAAGAAUGAAAUCHAUtt, siRNA ID: #s151576; siRNS 2: Sequence (5'→3': GCAAAGUCUCGAAAAUAUAtt, siRNA ID: #s220846) (Ambion) használtunk fel a transzfektáláshoz RNAiMAX Reagenttel (Invitrogen), a gyártói protokollnak megfelelően. Negatív kontrollnak PC12 sejteket transzfektáltunk nem-célzó Silencer Select siRNS-sel (Ambion). A transzfekció hatékonyságát *Sdhb* fehérje Western Blot vizsgálatával ellenőriztük.

6. Fehérje izolálása és Western Blot

Teljes fehérjét M-Per reagenssel (Thermo Fisher Scientific) izoláltunk a gyártó instrukcióinak megfelelően. A fehérje koncentrációját BCA Assay-el (Sigma-Aldrich) határoztuk meg. A teljes fehérje frakciót 10-15%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk külön, majd PVDF membránra vittük át és egy éjszakán át inkubáltuk SDHB ellenes antitesttel (5ug/mL; anti-SDHB, ab14714, Abcam). A fehérjék megfelelő betöltésének ellenőrzésére β -aktin antitestet (1:25000, Cell Signaling) használtunk. Anti-egér HRP IgG antitestet használtunk másodlagos ellenanyagként (1:2000, Agilent). A kapott jelek intenzitását Image J software-rel (Bethesda) vizsgáltuk.

7. Itakonát kezelés

Itakonátból (Sigma-Aldrich) 500 nM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, a pH 7.2-es értékre NaOH-oldattal korrigáltuk. A plate-ekre kiültetett sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk. PBS-sel történő mosás után a friss tápfolyadékhoz itakonátot adtunk 25 mM koncentrációban. Kontrollként nukleázmentes vizet (NFW) használtunk.

8. Atpenin kezelés

Az atpenin A5 (atpenin) reagenst az Enzo Life Sciences cégtől vásároltuk. 2mM törzsoldatot készítettünk abszolút etanollal. A sejteket az atpenin kezeléshez 6-lyukú plate-ekre ültettük ki. Egy nap inkubációt követően a sejtek médiumát friss tápfolyadékra cseréltük

PBS mosást követően. 1 μM atpenint adtuk a sejtekhez, kontrollnak abszolút etanolt használtunk.

9. Metabolit koncentrációk meghatározás tömegspektrometriával

A sejteket 6-lyukú plate-ekben növesztettük a metabolit profil elemzéséhez. A 24 órás PC12 metabolit koncentrációk vizsgálatához 9 itakonáttal kezelt és 9 kontroll rendszert használtunk. Az összes egyéb (48 órás PC12, valamint 24 és 48 órás HeLa és H295R) vizsgálatot egyszerre 3 párhuzamos, itakonáttal kezelt, illetve 3 kontroll (ugyanolyan térfogatú NFW-vel kezelt) sejttenyészetten végeztük.

A metabolitok koncentrációjának normalizálásához a metabolit profil mérésével egyenlő számú sejteket ültettünk ki 6-lyukú plate-ekre. A sejtek inkubációja és kezelése a korábban leírtakkal megegyezően történt. Inkubáció után a sejteket a már említett módon eltávolítottuk, majd a sejtekből DNS-t izoláltunk, melyhez a QIAcube (110V) (Qiagen) készüléket használtuk. A DNS koncentrációjának mérése NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készülékkel történt. Az adatok normalizálásához a megfelelő metabolit koncentrációkat ($\mu\text{mol/l}$) a hozzájuk tartozó DNS-koncentrációval ($\text{ng}/\mu\text{l}$) osztottuk, majd szoroztuk 1000-rel. A normalizált koncentrációk mértékegysége így $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ lett.

Az intracelluláris metabolitok közül laktát, piruvát, citrát, alfa-ketoglutarát, fumarát, glutamát, aszpartát, malát és szukcinát koncentráció mérés történt. A folyadékkromatográfiás elválasztást Perkin-Elmer Flexar FX10 HPL-vel, a tömegspektrometriás mérést ABSciex 5500 QTRAP készülékkel végeztük. A tömegspektrometriás mérés során az egyes metabolitok kvantitatív meghatározása a kiindulási és a fragmentációs ionok detektálásával (MRM- Multiple Reaction Monitoring) történt. A kromatográfiás elválasztás Phenomenex Luna Omega C18 (100x2,1mm, 1,6 μm) (GenLab Ltd.) típusú oszlopon történt. A mozgó fázis víz és metanol volt, mindkettő 0,1% hangyasavat (V/V) tartalmazott. A tömegspektrométer negatív elektronspray ionizációs módban mért a következő beállításokkal: hőmérséklet: 300°C, ionizációs feszültség: -4000 V, bemeneti potenciál: -10 V. A laktát, piruvát, citrát, alfa-ketoglutarát, szukcinát, fumarát, malát, glutamát és aszpartát koncentrációjának meghatározása kalibrációs görbék segítségével történt. Minden mintából 3 párhuzamos mérést készítettünk.

10. AlamarBlue – Viabilitási assay

A vizsgálatok 96-lyukú plate-eken történtek. Minden kísérletet 6 biológiai párhuzamos mintán végeztük el. A sejtek életképességét AlamarBlue assay használatával vizsgáltuk (Thermo Fisher Scientific). A sejtek életképességét 24, 48 és 72 óras után vizsgáltuk.

A kezelések adott inkubációs ideje után 10 µl AlamarBlue reagenst adtunk a rendszerhez, majd 37 °C-on, párasított, 5% szén-dioxidot tartalmazó környezetben 1 óra 15 perces inkubációt követően a sejtek fluoreszcenciáját (ex:560 nm; em:590 nm) detektáltuk Varioskan Flash plate reader készülékkel (Thermo Fisher Scientific).

11. Sejtproliferációs assay

A vizsgálatokat 96-lyukú plate-eken végeztük, hat párhuzamos kísérletben. A kezeléseket követően, a sejtproliferációt a Sulforodamin B (SRB) festéssel dokumentáltuk. Az abszorbancia mérése 570 nm-en történt, Varioskan Flash plate reader-rel (Thermo Fisher Scientific).

12. Sejtlégzés és extracelluláris savasodás

A valós idejű oxigénfogyasztási ráta (oxygen consumption rate, OCR) és extracelluláris savasodási ráta (extracellular acidification rate, ECAR) mérésére Seahorse XF96 Analyzer (Agilent) készüléket használtunk korábbi protokollok leírása alapján. A PC12 sejteket 96-lyukú Seahorse plate-ekre (Agilent) ültettük ki 100 µL tápfolyadékban, 30000 sejt/lyuk arányban, 24 órával a mérések megkezdése előtt. Az itakonát és az atpenin kezelést a sejtek 24 vagy 48 órával a mérések előtt kapták meg, míg az *Sdhb* géncsendesítést 48 órával a mérések előtt végeztük. A BPTES (bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2il)-etil szulfid) kezelést 24 órával a mérések előtt alkalmaztuk. A mérések napján a sejtek tápfolyadékát lecseréltük a következő összetételű médiumra (a számok mM-ban értendők): 120 NaCl, 3.5 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glükóz, pH 7.4. Ezt követően az alap OCR és ECAR értékeket 1,5 óra elteltével mértük.

A mérések közben frissen előkészített glutamint (4 mM) és/vagy anyagcsere inhibitorokat/modulátorokat (oligomycin 2µM, 2,4-dinitrophenol- DNP 200 µM és antimycin A + rotetone 1-1µM) adtunk minden egyes lyukhoz a kívánt koncentráció eléréséig.

13. Statisztikai analízis

Az összes mért adatot átlag ±SD formában adtuk meg, néhány esetet kivéve ahol ez külön jelölve van. Az eredményeink statisztikai analízisét GraphPad Prism 6 programmal végeztük (GraphPad Software Inc.). Az adatok Gauss-görbe szerinti eloszlását Shapiro-Wilks teszttel

vizsgáltuk. Normál eloszlású adatok esetén t-teszttel, egyéb esetben Mann-Whitney-próbával analizáltuk az eredményeink közti különbségeket. Statisztikailag szignifikánsnak a 0.05-nél kisebb p-értékeket vettük.

EREDMÉNYEK

1. *BRCA1* és *RET* mutációk együttes előfordulása

Egy 16 éves fiatal nőbeteget 2013-ban referáltak a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinikájára endokrinológiai kivizsgálás céljából. Hajhullása hátterének esetleges pajzsmirigy eredete és a pajzsmirigyben tapintott két göb miatt a háziorvosa endokrinológiai kivizsgálásra irányította a páciens. A pajzsmirigy és nyaki ultrahang, biopsziás és vékonytű biopsziás mintavételt követően a szövettani vizsgálat, komputerizált tomográfiás (CT) vizsgálat és a kalcitonin és karcinoembrionális antigén (CEA) szérumszintjeinek vizsgálata, majd az ezt követő sebészi teljes pajzsmirigy és lokális nyirokcsomók eltávolítása és szövettani vizsgálata alapján lokális nyirokcsomó metasztázist adó medulláris pajzsmirigy karcinóma diagnózisa került felállításra (A tumor TNM klasszifikációja: pT2N1a). Habár a szérum kalcitonin és CEA szintek jelentősen csökkentek a műtétet követő megfigyelési időszakban, teljes biokémiai remissziót nem sikerült elérni: a szérum kalcitonin szintek bizonytalan emelkedő tendenciát mutattak, azonban képző és szövettani vizsgálatok a posztoperatív időszakban recidívát, illetve metasztázist nem igazoltak.

Genetikai tanácsadást követően a beteget MEN2A szindróma gyanúja miatt a *RET* gén genetikai vizsgálatának vetették alá. A vizsgálat egy ismert patogén, MEN2A-ra hajlamosító heterozigóta mutációt (p.Cys634Trp) igazolt. Az ezutáni követési időszakban a beteg MEN2A szindróma egyéb manifesztációit nem mutatta. A részletes családi anamnézis felvétele során kiderült, hogy a beteg édesanyja és édesanyja lánytestvére is metasztatikus emlődaganat miatt hunytak el, mely felvetette az örökletes emlőrák szindróma valószínűségét. Genetikai vizsgálat során egy kereteltolódással járó patogén *BRCA1* mutáció igazolódott (*BRCA1* p.Ile90Serfs, NC_000017.10:g.41256905_41256917 delTGAAAAGCACAAA) a betegben. A klinikai kivizsgálás és a mágneses rezonancia vizsgálat (MRI) nem talált emlődaganatra utaló jelet, valamint az eddig eltelt utánkövetési időszakban sem emlő- sem petefészkek illetve egyéb daganatra utaló jel nem ábrázolódott.

Tekintettel az igazolt örökletes tumorszindrómákra, a beteg hozzátartozóit is bevontuk a *RET* és *BRCA1* gének szűrésébe. A beteg bátyja (kor: 36 év) és bátyja két fia (kor: 4 és 6 év) szintén hordozták a *RET* 11-es exon p.C634W mutációt, azonban a *BRCA1* mutáció nem igazolódott az esetükben. A beteg testvérében klinikai kivizsgálás során két pajzsmirigy göböt, laborvizsgálatokkal emelkedett kalcitonin szintet írtak le. Teljes pajzsmirigy eltávolítást követően kalcitonin szintjei a fiziológiás tartományba kerültek. A beteg testvérenek két fia megelőző pajzsmirigy eltávolításon esett át. Az eltávolított pajzsmirigyek szövettani vizsgálata MTC-re utaló jelet nem írt le. A beteg édesapja sem a *RET* sem a *BRCA1* mutációt nem hordozta.

2. Endogén Panel

2.1. Az Endogén Panel 1.0 kifejlesztése

A panel validálásához 17, genetikai diagnózissal rendelkező beteg mintáit használtuk fel. Közöttük 12 eset hordozott korábban már igazolt patogén mutációt (2 *RET*, 5 *SDHB*, 2 *TMEM127*, 2 *MEN1* és 1 *VHL*), melyek mindegyike beazonosításra került a panelszekvenálás során. A bioinformatikai módszerek és szűrési beállítások finomhangolását követően 68 fals pozitív hívást, kettő, ismeretlen jelentőséggel bíró, ún. VUS-t (variant of uncertain significance) és 25 esetben aminosavcserét okozó jóindulatú génpolimorfizmust mutattunk ki.

Az Endogén Panel első verziójának klinikai gyakorlati hasznát az Endogén Panel első verziójának 24 mintán teszteltük, melyek korábban nem rendelkeztek genetikai diagnózissal. A 24 mintából 10 esetben mutattuk ki összesen 11 patogén géneltérést (1 esetben *VHL*, 3 esetben *SDHB*, 7 esetben *NF1* génmutációt). Egy beteg esetében két különböző *SDHB* mutációt azonosítottunk: egy p.R90 kereteltolódással járó mutációján felül egy *SDHB* p.T88I variánst szintén validáltunk a páciensnél. Egy fiatal női páciens esetében a nyaki paragangliómájának háttérében egy feltételezhetően patogén *VHL*-mutációt azonosítottunk.

2.2. Az Endogén Panel 2.0 kifejlesztése

Az Endogén Panel 1.0 fejlesztése során szerzett tapasztalataink alapján átalakítottuk a szekvenálás protokollját, továbbfejlesztettük a bioinformatikai analízist illetve kibővítettük a szekvenált gének számát az alábbi génekkel: *GOT2*, *MAX*, *MDH2*, *SDHAF2*, *SLC25A11*. Az Endogén Panel 2.0 klinikai felhasználhatóságának vizsgálatába 38 Phaeo/PGL beteg mintáit vontuk be. Mintáink egytől egyig ismeretlen genetikával rendelkeztek, így klinikai

gyakorlatban tudtuk kipróbálni a panelünket. Patogén mutációt 10 esetben (26%) azonosítottunk. 3 mutációt az *SDHB* génben, 2 mutációt az *FH* génben, 4 betegben *NFI* és 1 betegben *VHL* mutációt igazoltunk. Nyolc VUS-t is kimutattunk. Ezek közül hármat olyan betegekben találtunk, amelyek bizonyítottan már patogén mutációt is hordoztak. Három VUS esetében felmerül a patogenetikai szerep, mert ezek nem szerepelnek egyik genetikai adatbázisban sem, a funkcionális predikciók alapján benignus vagy patogénikus hatásuk nem eldöntött.

3. Tumorbiológiai vizsgálatok

3.1. SDH gátlás eltérő hatással van a különböző sejtvonalak viabilitására és nem csökkenti a PC12 sejtek proliferációját

Sikeres SDH inhibíciót követően az *Sdhb* gén csendesítése és az itakonát kezelés szignifikánsan növelte a PC12 sejtek életképességét. Az atpenin kezelés is pozitív hatással volt a PC12 sejtek életképességére, azonban a különbség egyik inkubációs időpontban sem mutatott szignifikáns értéket. A PC12 sejtek proliferációjára nem volt szignifikáns hatással az *Sdhb* gén csendesítése, illetve itakonát vagy atpenin kezelés sem.

Az itakonát kezelés hatására a HeLa sejtek életképessége szignifikánsan csökkent, ezzel ellentétben az atpenin kezelés összességében pozitív hatással volt a HeLa sejtek életképességére.

A H295R sejtek életképességére mindkét SDH gátló módszer negatív hatással volt.

3.2. Metabolit profilok

Az SDH gátlás minden sejt esetében a szukcinát felhalmozódásával és fumarát csökkenéssel járt.

PC12 sejtek esetében az *Sdhb* csendesítés laktát akkumuláció nélkül szignifikánsan csökkentette az intracelluláris glutamát szinteket.

PC12 sejtek esetében az atpenin kezelés szignifikáns glutamátszint csökkenéssel társult. Ehhez az itakonát kezeléssel ellentétben laktát akkumuláció is társult.

Szemben a PC12 sejtekkel, HeLa és H295R sejtek esetében itakonát kezelést követően szignifikánsan emelkedtek a glutamát és laktát koncentrációk. Az atpenin kezelés a PC12 sejtekhez hasonlóan szignifikánsan csökkentette a glutamát koncentrációkat, ami szignifikáns laktát koncentrációemelkedéssel társult.

3.3. A GLS-1 expressziója összefüggést mutat a SDH enzim gátlásával

Az SDH gátlás utáni eltérő metabolit profilok nyomán a glutamin/glutamát anyagcsere egyik kulcsenzimét, a mitokondriális glutamináz-1 (GLS-1) enzimet vizsgáltuk. Szignifikáns növekedést mértünk PC12 sejtek GLS-1 génexpressziójában *Sdhb* gén csendesítését követően, illetve itakonát kezelés hatására. Ezzel ellentétben az atpenin kezelés csökkentette a *GLS-1* gén kifejeződését.

HeLa sejtek itakonát kezelésére szignifikánsan nőtt a GLS-1 expresszió. Atpenin kezelés hatására 24 óránál szignifikáns csökkenést, majd 48 óra elteltével szignifikáns növekedést mértünk a sejtek GLS-1 expressziójában.

A H295R sejtek GLS-1 expressziója szintén szignifikánsan nőtt itakonát és atpenin kezelés hatására is.

3.4. A GLS-1 és SDHB immunhisztokémiai vizsgálata Phaeo/PGL mintákban

Az *in vitro* talált eredményeink nyomán 35 Phaeo/PGL daganatok szövettani metszetein is megvizsgáltuk a GLS-1 és az SDHB expresszió közötti összefüggést. *SDHB* és *RET* csírarsejtes mutációhoz társuló daganatok metszeteit, illetve jóindulatú és rosszindulatú daganatok metszeteit hasonlítottuk össze. A *RET* mutációhoz társult és a sporadikus etiológiájú tumorokhoz képest az *SDHB* mutációhoz társuló daganatokban erősebb GLS-1 festés volt megfigyelhető, az eredmény azonban nem adódott szignifikánsnak. Az alacsony SDHB expressziót mutató tumorok 54%-a (7 a 13-ból) mutatott magas GLS-1 festődést, míg a magas SDHB festést mutató tumoroknak összesen csak a 22%-a (5 a 22-ből) mutatott magas GLS-1 festést.

Három *RET*-mutációhoz társuló mintában mértünk erősebb GLS-1 expressziót. A háromból két daganatban malignus (a 4. és 5. számú páciens visszatérő, lokális inváziót mutató és metasztatizáló tumorjai), míg a harmadik daganat a 6. számú MEN2A szindrómás páciens bilaterális, a minta esetén jobb oldali phaeochromocytómája volt.

A három malignus sporadikus tumor esetében kettőben volt mérhető magas SDHB-score, miközben egyik tumor sem mutatott erősebb GLS-1 festést. A benignus sporadikus minták esetében a 4 alacsony SDHB festődést mutatóból kettőben volt erősebb GLS-1 expresszió kimutatható immunhisztokémiával.

3.5. Az SDH enzim és a GLS-1 együttes gátlása csökkenti a PC12 sejtek proliferációját hagyományos és 3D modell esetében is

A GLS-1 gátláshoz bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2il)-etil szulfidot (BPTES), egy szelektív GLS-1 inhibitorot alkalmaztunk. A PC12 sejtek proliferációja BPTES kezelés hatására

szignifikánsan csökkent *Sdhb* gén csendesítés esetén, itakonát kezelés esetén és atpenin kezelés esetén is. Annak érdekében, hogy egy a daganatot jobban modellező *in vitro* környezetben is megvizsgáljuk feltevéseinket, 3D szferoid sejtmodell esetében vizsgáltuk a BPTES hatását az SDH itakonáttal történő gátlása mellett. Az itakonát kezelés önmagában nem csökkentette szignifikánsan az élő sejtek számát. Azonban amikor az itakonátot BPTES-sel kombináltuk, szignifikáns csökkenést mértünk az élő sejtek arányában a vivőanyaghoz képest.

3.6. Oxigénfogyasztással kapcsolatos mérések

A BPTES-sel kezelt kontroll sejtek esetében volt a legalacsonyabb a bazális respiráció, míg itakonát esetében a legmagasabb. A kontroll sejtekhez viszonyítva az itakonáttal kezelt PC12 sejtek szignifikánsan magasabb bazális oxigénfogyasztást mutattak, míg az *Sdhb* csendesítés szignifikánsan alacsonyabb bazális értékeket hozott a „mock” transzfektált sejtekhez képest. A transzfektált sejtek esetében a BPTES kezelés nem hozott szignifikáns különbséget.

A bazális respirációt 2mM glutamin adása után is megvizsgáltuk. Kismértékű változásokat figyeltünk meg a bazális respirációhoz képest itakonát (1,4%), atpenin (1,7%) és *Sdhb* csendesített (0,5%) PC12 sejtek esetén. Ennek az értéknek a szignifikáns csökkenését BPTES kezelés hatására csak az *Sdhb* csendesített PC12 sejtekben figyeltük meg. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk glutamin pótlást követően az *Sdhb* csendesített és a „mock” transzfektált PC12 sejtek között. A BPTES kezelés hatására azonban ez a szignifikáns különbség eltűnt.

Az itakonát kezelés és az *Sdhb* csendesítés szignifikánsan növelte a maximális respirációt. A BPTES kezelés a kontroll és az *Sdhb* csendesített sejtek esetében csökkentette szignifikánsan a maximális respirációt.

Az *Sdhb* csendesített PC12 sejtek esetében mértük a legmagasabb em-mitokondriális értékeket, amelyet a BPTES kezelés sem csökkentett szignifikánsan. Mind az itakonát, mind

az Sdhb csendesítés szignifikánsan növelte a nem-mitokondriális légzést a kontrollokhoz képest.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az újgenerációs szekvenáló módszerek előretörése önmagában nem garantálja a megfelelő diagnosztikát

Az újgenerációs szekvenáló módszerek klinikai előretörése napjainkban alapvetően határozza meg a klinikai genetikai diagnosztikát. Mindazonáltal ezek a módszerek önmagukban nem váltják ki a megfelelő genetikai konzultációt örökletes megbetegedések esetében. Esettanulmányunkban egy olyan páciens és családját mutattuk be, ahol a MEN2 szindróma háttérben álló *RET* mutációhoz egy örökletes emlő- és petefészek rákra hajlamosító *BRCA1* mutáció társult. A *BRCA1* mutáció szűrésére semmilyen indok nem szolgált a genetikai és családi anamnézis felvételéig. Ezeket követően viszont célzottan tudtuk vizsgálni az érintett géneket, így kimutatva a páciens és családja által hordozott mutációkat. A teljes genom, vagy akár önmagában csak a genom kódoló régióinak szekvenálása a klinikai gyakorlatban túlzottan idő- és pénzigényes, tehát genetikai szűrésre hatékonyan nem alkalmazható. A jövőben az NGS módszerek előretörése mellett is, csak megfelelő és alapos orvosi munkával kiegészülve biztosíthat nagy hatékonyságú diagnosztikai apparátust.

2. Az Endogén Panel, mint hatékony klinikai diagnosztikus eszköze az örökletes endokrin tumorszindrómáknak

Az Endogén Panellel szerzett tapasztalataink arra engednek következtetni, hogy segítségével gyorsan, pontosan és költséghatékonyan szűrhetők olyan megbetegedések, melyek háttérben genetikai eltérések állhatnak. A szekvenálási módszer mindenkor limitációt figyelembe véve a panel könnyen bővíthető további génekkel, melyek segítségével más betegségeket vagy újonnan leírt, daganatokra hajlamosító genetikai eltéréseket is ki tudunk szűrni a jövőben, költséghatékony módon. A célzott, több gén szimultán szekvenálását lehetővé tevő módszer esetében a legfontosabb a 100%-os szenzitivitás. Míg a fals pozitív eredményeket könnyen ellenőrizhetjük a hagyományos Sanger szekvenálással, úgy az álnegatív eredmények kiszűrésére hatékony módszer nem létezik.

Több gén célzott szekvenálása arra is rávilágított, hogy még alacsony mintaszám esetén is előfordulnak ritka vagy váratlan genotípus-fenotípus összefüggések. Ezeknek a genetikai

variánsoknak az egymásra gyakorolt hatása, illetve klinikai interpretálása a közeljövő egyik nagy kihívása lesz mind a klinikai genetikában mind pedig az onkológiában.

3. A GLS-1 mint szövettani prediktora a malignus betegségnek

Az SDH gátlás, akár farmakológiai úton itakonáttal vagy *SDHB* géncsendesítés által csak a kromaffin PC12 sejtek életképességére volt pozitív hatással. Ennek oka a sejtek eltérő glutamin/glutamát metabolizmusára vezethető vissza. Tanulmányunk egyik fő célja egy költséghatékony, megbízható modell létrehozása volt, mely új prognosztikus faktorok keresésében és terápiás célpontok megtalálásában nyújthat segítséget ezen ritka betegség esetében. Az általunk bevezetett itakonát kezeléssel a 3D sejtmodellben olcsón és könnyen lehet modellezni az SDH gátlást sejt-specifikusan.

Az immunhisztokémiai vizsgálataink során tapasztalt eltérések az *SDHB* expresszióban arra engednek következtetni, hogy még az *SDHB*-hez köthető tumorok is heterogének. Ezt erősíti az a megfigyelés, hogy a szukcinát/fumarát arány is eltérő ezekben a tumorokban arra utalva, hogy a megmaradt SDH aktivitás mértéke is különböző a tumorokban. A megmaradó, reziduális SDH aktivitás *in vivo* modellezését tette lehetővé az siRNS-sel történő géncsendesítés is, ami így a nem teljes SDH gátlás megfelelő modellje lehet. Mivel a PC12 sejtek itakonát kezelése hatékonyan utánozta az *SDHB* csendesítés következményeit, ezért hatékony *in vitro* modellként felhasználható. A glutamin/glutamát jelentőségét SDH-deficiens tumorok esetében igazoltuk. Kísérleteink során a GLS-1 expressziójának növekedését mutattuk ki SDH gátlást követően és SDH gátolt sejtekben a proliferáció csökkenését okozta a GLS-1 gátlás. Megfigyeléseinket alátámasztottunk Phaeo/PGL tumorok metszeteinek immunhisztokémiai vizsgálatával is, miszerint a GLS-1 expressziója fokozott volt a malignus tumorokban a benignusokban mértékhez képest. A kutatási eredményeink arra engednek következtetni, hogy a GLS-1 egy hatékony prognosztikus és terápiás célpont lehet a malignus Phaeo/PGL kezelésében, ahol jelenleg a terápiás lehetőségek rendkívül limitáltak.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények

1. Sarkadi, B., Meszaros, K., Krencz, I., Canu, L., Krokker, L., Zakarias, S., Barna, G., Sebestyen, A., Papay, J., Hujber, Z., Butz, H., Darvasi, O., Igaz, P., Doczi, J., Luconi, M., Chinopoulos, C., & Patocs, A. (2020). Glutaminases as a Novel Target for *SDHB*-Associated Pheochromocytomas/Paragangliomas. *Cancers*, 12(3), 599. <https://doi.org/10.3390/cancers12030599>

2. Sarkadi, B., Baghy, K., Sápi, Z., Nyiró, G., Likó, I., & Patócs, A. (2019). Germline *BRCA1* Mutation Detected in a Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Case With *RET* Codon 634 Mutation. *Frontiers in genetics*, *10*, 544. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00544>
3. Sarkadi, B., Grolmusz, V., Butz, H., Kövesdi, A., Likó, I., Nyiró, G., Igaz, P., & Patócs, A. (2018). Molekuláris genetikai vizsgálatok az örökletes endokrinológiai tumor szindrómák klinikai diagnosztikájában, *Orvosi Hetilap OH*, *159*(7), 285-292. Retrieved Aug 9, 2020, from <https://akjournals.com/view/journals/650/159/7/article-p285.xml>
4. Sarkadi, B., Butz, H., Darvasi, O., Igaz, P., Liko I., & Patocs, A. (2020). Clinical application of targeted panel sequencing in pheochromocytomas/paragangliomas (feltöltés alatt)