

Genetikai és epigenetikai biomarkerek neuroendokrin daganatokban

Doktori értekezés

Dr. Kövesdi Annamária

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Küronya Zsófia, PhD., egyetemi adjunktus

Dr. Gál Anikó, PhD., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

Tagok: Dr. Hubina Erika, PhD., főorvos

Dr. Beke Artúr, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest
2022

1. Bevezetés

A neuroendokrin daganatok (NET) az agyalapi mirigy, a thymus, a mellékvesevelő endokrin sejtjeiből, valamint a diffúz neuroendokrin rendszer sejtjeiből (pl. tüdő, gastrointestinalis traktus) indulnak ki. 20%-uk örökletes daganatszindrómához társul, mint pl. a multiplex endokrin neoplasia 1-es (MEN1), 2A és 2B típusai, a Von-Hippel-Lindau szindróma, a neurofibromatosis 1-es, a phaeochromocytoma/paraganglioma szindrómák, többségük azonban sporadikus megjelenésű. A neuroendokrin daganatokban megfigyelt alacsony mutációs ráta alapján felvetődik, hogy más mechanizmusok, például epigenetikai változások járulnak hozzá a NET-ek kialakulásához és progressziójához.

A MEN1 ritka daganatszindróma, három fő manifesztációja a mellékpajzsmirigy túlműködés (primer hyperparathyreosis, PHPT), a gastroenteropancreaticus neuroendokrin daganatok (GEP-NET), valamint az agyalapi mirigy adenoma (pituitary adenoma, PA). A fenotípusban jelentős variabilitás figyelhető meg. A manifesztációk a sporadikus daganatokhoz képest jellemzően fiatalabb életkorban alakulnak ki, gyakran multiplex formában. A familiáris MEN1 esetek 70-90%-át a tumor szuppresszor menin fehérjét kódoló *MEN1* gén csírasejtes heterozigóta mutációja okozza; a sporadikus MEN1 esetek kis részében *de novo* mutáció alakul ki. A klinikailag MEN1 szindrómás, *MEN1* mutációt nem hordozó eseteket fenokópiának nevezzük. A phaeochromocytomák és a paragangliomák (PPGL)

chromaffin sejtekből származó ritka neuroendokrin tumorok, 40%-ban öröklődő mutációk okozzák. Többnyire jóindulatúak; azonban semmilyen, a malignitást előrejelző tényező nem ismert.

A chromogranin A (CgA) napjainkig a leggyakrabban használt neuroendokrin tumormarker, az utóbbi években azonban alacsony szenzitivitására és specifitására derült fény, alkalmazása így háttérbe szorult. Az utóbbi években a miRNS-ek bizonyultak ígéretes biomarkereknek különböző betegségekben.

2. Célkitűzések

- a) A hazai MEN1 adatbázis elkészítése, a mutáció-pozitív és -negatív esetek összehasonlításával olyan tulajdonságokat kerestem, amelyek előrejelzik a pozitív genetikai tesztet.
- b) *MEN1* mutációk és a potenciálisan MEN1 gént targetáló miRNS-ek hatásának vizsgálata a menin deficienciára MEN1-asszociált és sporadikus PHPT szövetekben.
- c) pancreas neuroendokrin tumorok (pNET) szöveti miRNS expressziójának vizsgálatával olyan proliferációtól függően eltérő expressziójú miRNS-eket kerestünk, amelyek prognosztikus markerként szolgálhatnak.
- d) pNET-es és phaeochromocytomás betegek, valamint protonpumpa inhibitorot szedő és nem-

szedő kontrollok bevonásával keringő miRNS-ek diagnosztikus hatékonyságának meghatározása a CgA-hoz képest.

3. Módszerek

3.1. MEN1 szindrómás betegek vizsgálata

2001-2017 között *MEN1* genetikai vizsgálatra referált összes beteget bevontuk vizsgálatunkba. Elvégeztük a *MEN1* gén Sanger szekvenálását. Összegyűjtöttem a betegek klinikai és genetikai adatait. A MEN1-gyanús, *MEN1*-negatív esetben, akiknél mindhárom major manifesztáció kialakult vagy két major manifesztációt hordoztak 40 éves kor alatt, elvégeztük a *CDKN1B* gén vizsgálatát és MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) vizsgálatot a nagy *MEN1* deléciók detektálására.

3.2. Menin, *MEN1* és miRNS expresszió vizsgálata PHPT szövetekben

A menin immunhisztokémiai vizsgálatát Dr. Borka Katalin végezte (II. sz. Patológiai Intézet). PHPT szövetekből a *MEN1* gént Sanger szekvenálással elemeztük. *In silico* módszerrel kerestünk a *MEN1* 3' UTR régióját potenciálisan célzó miRNS-eket. A kiválasztott 6 miRNS expresszióját PHPT szövetekben qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) módszerrel kvantifikáltuk.

3.3. miRNS-ek vizsgálata pancreas NET szövetmintákban

In silico reanalizáltuk egy korábban publikált vizsgálat 40 pNET szövet minta miRNS expressziós profilját ("discovery" kohorsz). 1999 és 2015 között a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézetből 63 független, primer pNET mintát használtunk fel a kiválasztott 5 miRNS expressziójának validálásához qRT-PCR módszerrel.

3.4. Chromogranin A mérés és keringő miRNS profilozás egészséges és NET mintákban

24 mintán határoztuk meg a keringő miRNS expressziót, újgenerációs szekvenálással (8 pNET (ebből 4 alacsony és 4 magas CgA szintű beteg mintája), 8 PPGL és 8 kontroll minta). Ezeken felül további 17 pNET és 12 PPGL beteg szérummintáját használtam fel validálásra. 5 olyan kontroll személyt is választottunk, akiknek proton pumpa inhibitor (PPI) szedés előtti és utáni mintáit is felhasználtunk. A kiválasztott keringő miRNS-ek expresszióját qRT-PCR módszerrel validáltuk.

4. Eredmények

4.1. A hazai MEN1 adatbázis

27 probandban és 20 családtagban azonosítottunk csírsejtes *MEN1* mutációt. A 24 különböző mutációból ötöt még nem írtak le, ezeket új mutációként tartjuk számon. A 77 mutáció-negatív probandból 37 (48,1%)

esetben teljesültek a MEN1 szindróma klinikai kritériumai. A MEN1 szindróma kritériumait teljesítő sporadikus esetek közül (11 *MEN1*-pozitív és 37 *MEN1*-negatív eset) 77,1%-ban alakult ki fenokópia (37/48). A GEP-NET több mint 15 évvel fiatalabb életkorban alakult ki *MEN1* mutációt hordozók esetén, mint nem-hordozók esetén. A három major manifesztáció egyidejű fennállása mellett a 30 éves életkor előtt jelentkező GEP-NET-nek volt a legerősebb, 78,6%-os pozitív prediktív értéke a *MEN1* mutáció hordozására.

4.2. *MEN1*, *menin* é miRNS expresszió összefüggése PHPT szövetekben

A *menin* expresszió hiányát találtuk az összes MEN1-asszociált PHPT szövetben, valamint a sporadikus formák 27,5%-ában. A 40 sporadikus PHPT szövet közül 10 esetben (25%) találtunk szomatikus *MEN1* mutációt. Az összesen 23 *menin*-negatív PHPT esetből (amelyből 12 MEN1-asszociált és 11 sporadikus) 19 esetben (12 MEN1-asszociált és 7 sporadikus) találtunk a PHPT szövetben szomatikus *MEN1* mutációt. MiRNS targetpredikció segítségével 35 miRNS-t találtunk, amelyek a *MEN1* gén 3' UTR régiójához kötődnek, ebből 6 miRNS-t választottunk ki további vizsgálatra. Nem találtunk szignifikáns különbséget a miRNS expresszióban a *menin*-pozitív és *menin*-negatív PHPT szövetek között, a csírarsejtes *MEN1* mutációtól függetlenül. Ugyanakkor a miR-24 és miR-28 magasabb expresszióját találtuk sporadikus, nem-szindrómás PHPT szövetekben a MEN1-asszociáltakhoz képest.

4.3. Prognosztikai jelentőségű miRNS-ek pancreas NET szövetekben

A korábbi eredmények *in silico* reanalízisével a felderítő kohorszban (discovery cohort) 19 olyan miRNS-t találtunk, amelyek eltérő módon fejeződtek ki a pNET grádusokban. Öt miRNS-t választottunk validálásra. A miR-21, miR-10a és a miR-106b felülexpresszáltak voltak a magasabb proliferációjú pNET-ekben a grade I tumorokhoz képest. Többváltozós analízissel a miR-21 független prognosztikus tényezőnek bizonyult pNET-ben.

4.4. Keringő miRNS biomarkerek pancreas NET-ben és PPGL-ben

Alacsony globális miRNS expressziót figyeltünk meg a mintákban, emellett szignifikánsan alacsonyabb volt a teljes miRNS expresszió pNET és PPGL mintákban a kontrollokhoz képest. Az igen alacsony read-számú mintákat kizártuk a további analízisből. Hierarchikus cluster-analízissel 33 olyan miRNS-t találtunk, amelyek egyértelműen elkülönítették a pNET és PPGL betegeket az egészséges kontroll mintáktól, függetlenül a PPI szedéstől. Nem sikerült a pNET és PPGL mintákat elkülöníteni egymástól miRNS mintázat alapján. Az újgenerációs szekvenálással kapott miRNS abundancia alapján választottunk ki 6 miRNS-t validálásra, amelyek közül mind alulexpresszált volt: let-7b-5p; let-7i-5p; miR-143-3p; miR-30d-5p; miR-451a; miR-486-5p. Nem találtunk különbséget a pNET/PPGL és a PPI-t szedő kontrollok miRNS expressziója között. A CgA és 4

miRNS-ből (let-7b-5p, let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, miR-30d-5p) álló kombináció elkülönítő ereje bizonyult a legjobbnak a pNET és a kontroll csoport diszkriminációjára. A klinikai gyakorlatban nehézséget jelentenek azok a pNET-ben szenvedő betegek, akiknél alacsony CgA szintet (<100 ng/mL) mérünk. A miRNS profilozás ezért különösen érdekes lehet ezekben az esetekben. A CgA és 5 miRNS kombinációja (let-7b-5p, let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, miR-30d-5p, miR-486-5p) diszkriminálta a legjobban az alacsony CgA szintű pNET mintákat a kontrollokhoz képest (CgA szinttől függetlenül) egy logisztikus regressziós modellben; 89,4%-os diagnosztikus pontossággal.

5. Következtetések

5.1. A hazai MEN1 adatbázis eleméze

Elvégeztem a hazai MEN1 kohorsz átfogó genetikai és klinikai elemzését. Eredményeink alapján a *MEN1* mutációk becsült frekvenciája Magyarországon 0,48/100.000 fő, amely a szakirodalomban közölt adatokhoz képest kissé alacsonyabb. A 24 különböző *MEN1* mutációból ötöt közleményünk megjelenésének idejében legjobb tudomásunk szerint még nem közöltek. A 27 genetikailag igazolt MEN1 szindrómás index betegen kívül 77 független, MEN1-re utaló klinikumú (MEN1 gyanús) index beteget referáltak Endokrin Genetikai Laboratóriumunkba; ez utóbbiak között nem találtunk *MEN1* mutációt. A MEN1 szindrómás betegek között a fenokópia aránya 77,1% volt (37 mutáció-negatív

és 11 mutáció-pozitív eset, összesen 48 sporadikus MEN1 szindrómás eset), ez a korábban publikált becsléseknél magasabb. A fő MEN1-asszociált endokrin tumorok sporadikus együttes előfordulása egy egyénen belül (koincidencia) sokkal gyakoribb, mint korábban feltételeztük. A MEN1-asszociált GEP-NET-ek ráadásul 15 évvel korábban alakultak ki, mint sporadikus esetben. A MEN1 manifesztációi közül a 30 év alatt kialakult GEP-NET volt a legerősebb előrejelzője a csírasejtes *MEN1* mutáció hordozásának. Vizsgálatunkban, bár korlátozott esetszámmal, elsőként támasztottunk alá egy nemrég felvetődött javaslatot: a 30 év alatt jelentkező GEP-NET esetek felvételének szükségességét a *MEN1* genetikai vizsgálat indikációs kritériumai közé.

5.2. *MEN1* mutációk és *MEN1*-et célzó miRNS-ek jelentősége a PHPT pathogenesisében

A vártaknak megfelelően, a MEN1 szindrómához asszociált PHPT szövetekben immunohisztokémiai vizsgálattal nem detektáltunk nukleáris menin fehérjét. Csírasejtes mutációkon kívül szomatikus mutációk is okozhatják a menin kifejeződés hiányát és hozzájárulhatnak a daganatképződéshez. A 11 menin-negatív, sporadikus, nem-szindrómás PHPT szövetből 7 esetben (63,6%) igazoltunk szomatikus mutációt, amely a menin hiányért felel. A 4 *MEN1*-mutáció nélküli menin-negatív esetet okozhatták a MEN1 gén nem-kódozó, szabályozó régiójában levő mutációk, amelyeket a primereink általi szekvenálás nem fedett le; illetve más, instabil menin fehérjét eredményező tényezők is.

Demonstráltuk, hogy legnagyobbbrészt csírasejtes és szomatikus *MEN1* mutációk okozzák a menin hiányát PHPT szövetekben. Munkánkban elsőként hasonlítottuk össze *MEN1*-asszociált és sporadikus szövetek *MEN1*-et targetáló miRNS-einek expresszióját. *In silico* analízissel 35, a *MEN1* 3' UTR régióját célzó miRNS-t találtunk, ezekből azt a 6 miRNS-t választottuk további vizgálatra. Nem találtunk szignifikáns különbséget a miRNS expresszióban sem a menin-negatív vs. -pozitív szövetek között. Ugyanakkor a miR-24 és miR-28 expressziója szignifikánsan magasabb volt sporadikus PHPT szövetekben a *MEN1*-asszociáltakhoz képest, függetlenül a sporadikus szövetek menin immunoreaktivitásától. Az általunk vizsgált miRNS-ek közül a miR-24 esetén igazoltak interakciót a menin expressziójával a mellékpajzsmirigyben és az endokrin pancreasban. Nem állíthatjuk biztonsággal, hogy a potenciálisan *MEN1*-et targetáló miR-24 és miR-28 magasabb szintje a menin csendesítésén keresztül fejtik ki hatásukat, emelkedett expressziójuk azonban valószínűleg fontos génexpressziós változásokat okoz a sporadikus PHPT-k pathogenesisében.

5.3. Prognosztikus jelentőségű miRNS-ek pancreas NET-ekben

Napjainkig nem sikerült megfelelően szenzitív, specifikus és elérhető biomarkert találni pancreas neuroendokrin tumorok diagnosztikájában és kezelésében. *In silico* reanalízisünkkel 19, a pNET tumor grádusoknak megfelelően eltérően expresszálódó miRNS-t találtunk.

Egy nagyobb független validációs kohorszon qRT-PCR validációval három miRNS-ről (miR-21, miR-10a, miR-106b) sikerült igazolni a szignifikánsan magasabb expressziót az erősen proliferatív csoportban. A validációs kohorszban a miR-21 esetén találtuk a legnagyobb különbséget a grade-ek között, magasabb expressziót mutatott a grade 3 daganatokban. Ezen eredményünk megerősíti két korábbi, nagy esetszámú vizsgálatban közölt összefüggést a miR-21 expresszió és pNET kialakulása és agresszívebb lefolyása között.

5.4. Keringő miRNS-ek diagnosztikus értéke hormonálisan inaktív pancreas NET-ekben

Elsőként vizsgáltuk a keringő miRNS-ek diagnosztikus jelentőségét a CgA-val összefüggésben pNET betegekben. A 33 eltérően expresszálódó keringő miRNS profilja alapján elkülönítettük a pNET/PPGL betegeket a kontrolloktól (PPI szedés utáni mintákkal együtt). Nem tudtunk azonban különbséget tenni a miRNS profil alapján a pNET és PPGL minták között. Ennek egyik oka lehet ezeknek a daganatoknak a közös enterochromaffin eredete. A protonpumpa gátló kezelés által okozott szérum CgA szint emelkedés csökkenti a szérum CgA klinikai hasznát neuroendokrin daganatos betegekben. MiRNS-ek és a CgA kombinációja növelte a CgA diagnosztikus értékét. Különösen fontos esetben: alacsony CgA szintű pNET betegekben – amely esetekben a CgA nem nyújt segítséget a daganat diagnózisában – olyan miRNS kombinációt találtunk, amely a CgA-val együtt magas diagnosztikus értéket ért el.

Az értekezés alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke:

Kövesdi, A. ; Kurucz, P.A. ; Nyíró, G. ; Darvasi, O. ; Patócs, A.; Butz, H. Circulating miRNA increases the diagnostic accuracy of chromogranin a in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *CANCERS* 12 : 9 Paper: 2488 , 20 p. (2020)

IF: 6,639

Kövesdi, Annamária ; Tóth, Miklós ; Butz, Henriett ; Szücs, Nikolette ; Sárman, Beatrix ; Pusztai, Péter ; Tőke, Judit ; Reismann, Péter ; Fáklya, Mónika ; Tóth, Géza; Somogyi Anikó; Borka Katalin; Erdei Annamária; Nagy Endre; Deák Veronika; Valkusz Zsuzsanna; Igaz Péter; Patócs Attila; Grolmusz Vince Kornél. True MEN1 or phenocopy? Evidence for geno-phenotypic correlations in MEN1 syndrome. *ENDOCRINE* 65 : 2 pp. 451-459. , 9 p. (2019)

IF: 3,235

Grolmusz, VK ; Kövesdi, A ; Borka, K ; Igaz, P ; Patócs, A. Prognostic relevance of proliferation-related miRNAs in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* 179 : 4 pp. 219-228. , 10 p. (2018)

IF: 5,107

Grolmusz, Vince Kornél ; Borka, Katalin ; Kövesdi, Annamária ; Németh, Kinga ; Balogh, Katalin ; Dékány, Csaba ; Kiss, András ; Szentpéteri, Anna ; Sárman, Beatrix

; Somogyi, Anikó ; Csajbók Éva; Valkusz Zsuzsanna, Tóth Miklós, Igaz Péter, Rác Károly; Patócs Attila. MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN1 syndrome-associated primary hyperparathyroidism. VIRCHOWS ARCHIV 471 : 3 pp. 401-411. , 11 p. (2017)

IF: 2,936