

Előzmények

Magyarországon a halálozási statisztikák második helyén állnak a malignus tumorok, a cardiovascularis mortalitás mögött. A pajzsmirigy tumorok az európai és magyarországi statisztikák szerint nem túl gyakori, mind a férfiak, mind a nők rákos halálozási mutatói esetében. A pajzsmirigy tumorok kialakulásának rizikó faktorai közé tartozik az ionizáló sugárzás, beleértve az esetleges sugárterápiákat és a nukleáris katasztrófákat. Megemelkedett incidenciát írtak le a Csernobili atomreaktor baleset után, valamint a Japánt ért nukleáris támadások utóhatásaként is.

A thyroid tumorok kialakulása az epithelialis carcinogenezis többlépcsős modelljeként írható le. Tumor szuppresszor gének, és az onkogének három fő csoportjába tartozó gének (GTP-kötő protein, sejtmagi transzkripció faktor, tirozin kináz) mutációinak, expressziós mintázatának megváltozása szerepet játszik a tumor kialakulásában, progressziójában.

Célkitűzéseink között szerepelt az irodalomban közölt génexpressziós mintázatok magyarországi populáción való vizsgálata, valamint egyéni rizikóbecslés alátámasztása érdekében egyes gének genetikai polimorfizmusának vizsgálata pajzsmirigy tumoros betegek mintáiból. RNS micro-array segítségével meghatározzuk különböző, de főként hámeredetű pajzsmirigy tumorok jellemző génexpressziós profilját, mely megalapozza egy, ún: „thyroid chip” megszerkesztését, létrehozását.

Eredményeink azt mutatják, hogy meghatározható egy jellegzetes – 90-100 génből álló – génexpressziós profil pajzsmirigy tumorok esetén, de kutatási eredményeink még kvantitatív RT-PCR-os alátámasztásra szorulnak (jelenleg folyó kísérlet), valamint nagyobb mintaszámon vissza kell ellenőrizni hipotézisünket.

Eredmények

Protein expressziós vizsgálatok

Többek között a Ha-ras gén mutációit, a pajzsmirigy több típusú tumoraiban is kimutattak, mely mutációk feltételezhetően a rák kialakulásának egyik korai eredményei.

Cyclin D1, cyclin dependens kináz inhibitor, p21, ösztrogén receptor emelkedett expresszióját is kimutatták.

Munkánk során az onkogének közül a Ha-ras, a c-myc amplifikációinak, p53 gén deléciójának gyakoriságát vizsgáltuk pajzsmirigy hámeredetű tumoraiban, valamint ciklin D1, p53, p21, ösztrogén receptor fokozott expresszióját határoztuk meg immunhisztokémiai módszerekkel.

Kísérleteink során a vizsgált tumorkok 50%-ában mutattunk ki immunhisztokémiai módszerekkel p21 overexpressziót, a minták 66 %-ában p53 overexpressziót, melyek nem társultak DNS amplifikációval (hibridizációs assay), szignifikáns összefüggést találtunk a ciklin D1 és a p21 expressziója között, a ciklin dependens kináz inhibitor (p21/WAF1) gyakran társult ciklin D1 pozitivitással

Genetikai polimorfizmus

Első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy a pajzsmirigy hámeredetű tumorainak kialakulásában és a betegség lefolyásában szerepet játszhatnak-e olyan immungenetikai faktorok, amelyek az emberi fő hisztokompatibilitási rendszeren (MHC) belül találhatóak. 74 pajzsmirigy tumoros betegnél végeztünk HLA tipizálást, 54 betegnél papilláris karcinómát, 16-nál follikuláris karcinómát, 4-nél anaplasztikus tumort igazoltak a szövettani vizsgálatok. Kontrollként pajzsmirigy-tumortól mentes egyének mintáit használtuk (170 fő). Az HLA I. osztály vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns különbséget a beteg és a kontrollcsoport HLA eloszlása között, azonban a HLA II. osztály vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a HLA-DR1 és HLA-DR11 gyakrabban fordult elő pajzsmirigy tumoros paciensek esetén.

A 25 pajzsmirigy tumoros páciens paraffinos blokkjaiból izolált DNS-en XRCC1 gén polimorfizmusát vizsgáltuk, multiplex PCR-RFLP-vel. Kontrollként archiv anyagokat használtunk, tumortól mentes páciensek szövetmintáit. A génben a 6. exon 194 kodonját (Arg/Arg) valamint a 10. exon 399 kodonját (Glu/Glu) vizsgáltuk. Eredményeink szerint a 6. exon 194 kodonján a vad típus a pajzsmirigy tumorkok protektív faktoraként jelentkezett a 10. exon 399 kodonja esetén nem fedeztünk el szignifikáns különbséget.

A 17-es kromoszóma rövid karján levő *p53* tumor szuppresszor génnek kulcsszerepe van a sejtciklusnak, illetve a sejt fontos életfolyamatainak (replikáció, DNS-repair, apoptózis) szabályozásában. A *p53* tumor szuppresszor gén az "egyéni érzékenység" típusú hatást is kifejthet: a *p53* génnek ismeretesek genetikai polimorfizmusai is. E polimorfizmusok egy része intronok területére esik, tehát fehérjeszinten egyáltalán nem jelentkezik, de van olyan allélpolimorfizmus is, amely a kódolt aminosav megváltozásához vezet. Ez azonban feltehetően nem okozza a fehérje tulajdonságainak nagymérvű változását, és ezáltal a biológiai funkciókra sincsen olyan drámai hatással, mint a már említett pontmutációk.

Az allélpolimorfizmus a 72-es kodon területén található G-C báziscsere, amely a fehérjében Arg/Pro (CGC – Arg, CCC – Pro) formában jelentkezik. A kétfajta *p53* protein tulajdonságait, illetve különbségeit nem ismerjük pontosan, de feltételezhető, hogy a transzaktivációs domén

területén levő szubsztitúció (arginin – nagy poláros oldallánc, prolin – kis apoláros oldallánc) valamelyest megváltoztatja a fehérje viselkedését. Az allélek megoszlása érdekes földrajzi változékonyságot mutat: A *Pro* allél gyakorisága északról dél felé haladva növekszik. A Svédország északi részén élő lappok között a *Pro* allélgyakoriság kb 17%, majd dél felé haladva (finnek 24%, svédek 28%, kínaiak 38%, indiaiak 54%) egyre nő, és Nigériában eléri a 63%-ot.

Molekuláris biológiai vizsgálatok szerint az Arg allélnak az apoptózist indukáló képessége valamivel erősebb, mint a *Pro* allélé. Ezen elméleti megfontolások alapján elképzelhető, hogy a *Pro* allél valamelyest emeli egyes daganatok kialakulásának kockázatát.

Beteg		Kontroll
136	Arginin homozigóta	281
21	Prolin homozigóta	18
50	Heterozigóta	129

Vizsgálataink során a p53 *Pro* allélre vonatkozó esélyhányadost 2.484-nek számoluk, (95% CI=1.049-6.020) mely kockázati tényezőnek tekinthető

RNS micro-array

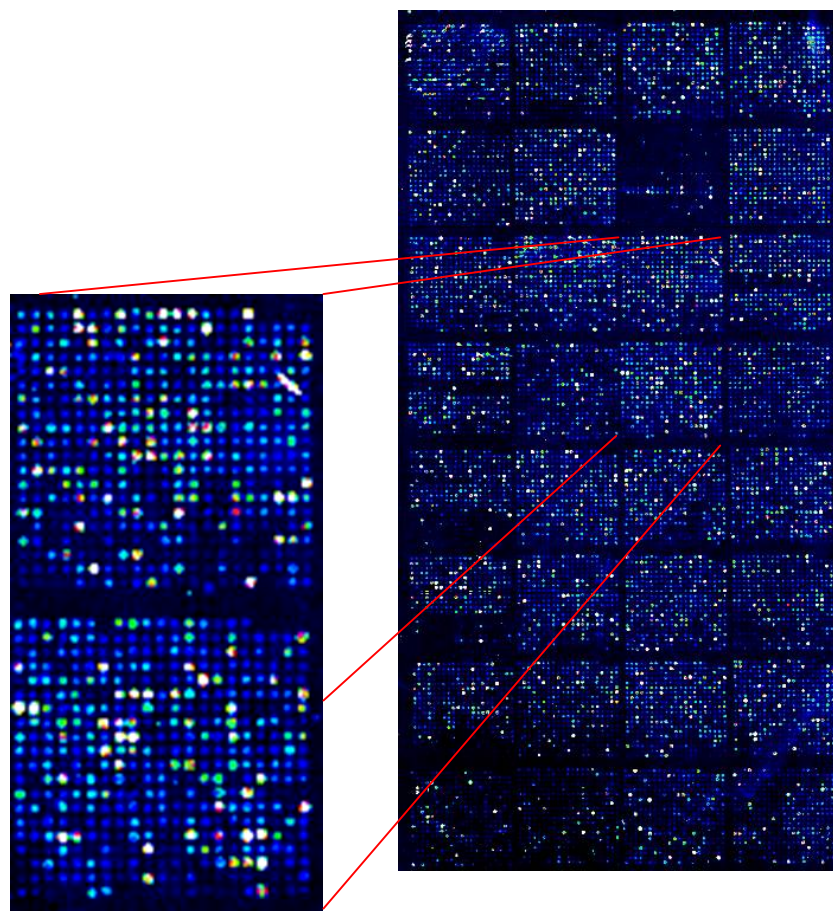
A pályázat során egy olyan oligonukleotid alapú humán DNS-chipet használtunk fel, amely több, mint 18.000 génspecifikus mintát tartalmaz, és amelyet az MTA Szegedi Biológiai Központ Funkcionális Genomika Laboratóriumában nyomtattak (MicroGrid II, Genomic Solutions, Cambridge, UK csipkészítő robot segítségével). A csipen 18.500 darab oligonukleotidot tartalmazó humán génspecifikus könyvtárból származó, 60 nukleotid hosszúságú amino-módosított oligonukleotidok vannak rögzítve, amely 17.260 egyedi gén expressziójának egyidejű szűrését teszi lehetővé.

Az elkészített DNS-chipeket follikuláris adenomából, karcinómából, papilláris karcinómából és normál pajzsmirigy szövetből nyert, majd fluoreszcensen jelzett, átírt RNS-sel hibridizáltuk és lézerskenner (Agilent) segítségével leolvastuk.

Első lépésben a különböző pajzsmirigy szöveteket porítottuk, majd teljes RNS-t nyertünk ki belőlük RNS tisztító kit felhasználásával (Macherey-Nagel, Düren, Németország). A tisztítás protokoll fő előnye, hogy nagyon jó minőségű RNS-t szolgáltat genomiális DNS szennyeződést szinte egyáltalán nem tartalmaz. Minden egyes mintacsoportból egyenként 4 egyedi mintát dolgoztunk fel.

A két fluoreszcens festékkel történő jelölés helyett egy (Cy5) festéket használtunk, ami egyrészt lehetővé tette bármelyik mintacsoport összehasonlítását, másrészt azt találtuk, hogy az általában használt két fluoreszcens festék eltérő viselkedése miatt így lecsökkentettük a fals pozitív eredmények számát. Továbbá sokkal több arányt állítható fel, amely megbízhatóbb statisztikai elemzést tesz lehetővé.

A minták feldolgozásánál még egy újítást vezettünk be. Az eddigi lineáris mintasokszorozási eljárás helyett egy sokkal hatékonyabb jelölési stratégiát állítottunk be, mely jelsokszorozáson alapul, így nem torzítja a kiindulási RNS-ek mennyiségi arányát és nem függ a mintasokszorozás egyedi eltéréseitől. A jelölés lényege, hogy két lépcsős hibridizálás során a chipre már bekötődött cDNS molekulákhoz egy 350-900 fluoreszcens festéket tartalmazó gömbszerű óriásmolekula kötődik, így egy hibridizációs eseményt 350-900 festékmolekula emissziója követ, ami az érzékenységet két nagyságrenddel megnöveli. A technika a GenisphereTM jelölési stratégiát követi egyedi módosításokkal. Ezzel a technikával már 1 µg alatti teljes RNS is jelölhető, ami igen fontos kis biológiai vagy klinikai minták esetében.



Oligonukleotid alapú humán cDNS-chip egy részlete

A DNS-chipeket egy automata hibridizációs központ (Ventana Discovery) segítségével végeztük, amely alkalmas DNS-chipek validált körülmények közötti gyors és hatékony hibridizációjára. Segítségével egyenletes próbaeloszlás érhető el a DNS-chipek felületén, ami pontosabb és reprodukálhatóbb kísérleteket tesz lehetővé.

A négy csoportból (follikuláris adenomából, karcinómából, papilláris karcinómából és normál pajzsmirigy szövet) összesen 16 jelölést és chip hibridizálást végeztünk el. Páronként 4-4 összehasonlítást tettünk, amelynek során 9-14 arányt (MEAN) határoztunk meg. T-próbával meghatároztuk a szignifikáns ($p < 0.05$) aránypárokat. Ez az érték azt mutatja meg, hogy az adott mintában egy adott gén kifejeződése hányszorosa a kontrolléhoz képest.

Összesen 4 összehasonlítást végeztünk el:

1. follikuláris adenoma - normál pajzsmirigy szövet
2. follikuláris adenoma - follikuláris carcinoma
3. papilláris carcinoma - normál pajzsmirigy szövet
4. follikuláris carcinoma - normál pajzsmirigy szövet

Minden egyes összehasonlításban csak azokra a génekre összpontosítottunk, amelyek (1) szignifikáns változást mutattak; (2) relatív génkifejeződési különbség legalább kétszeres volt; (3) amelyek minden egyedi összehasonlítás esetében (9, illetve 14) hasonló változást mutatott.

Ezzel a megközelítéssel sokkal megbízhatóbbá tettük az eredményeket és így pontosabb interpretálásra nyílik mód.

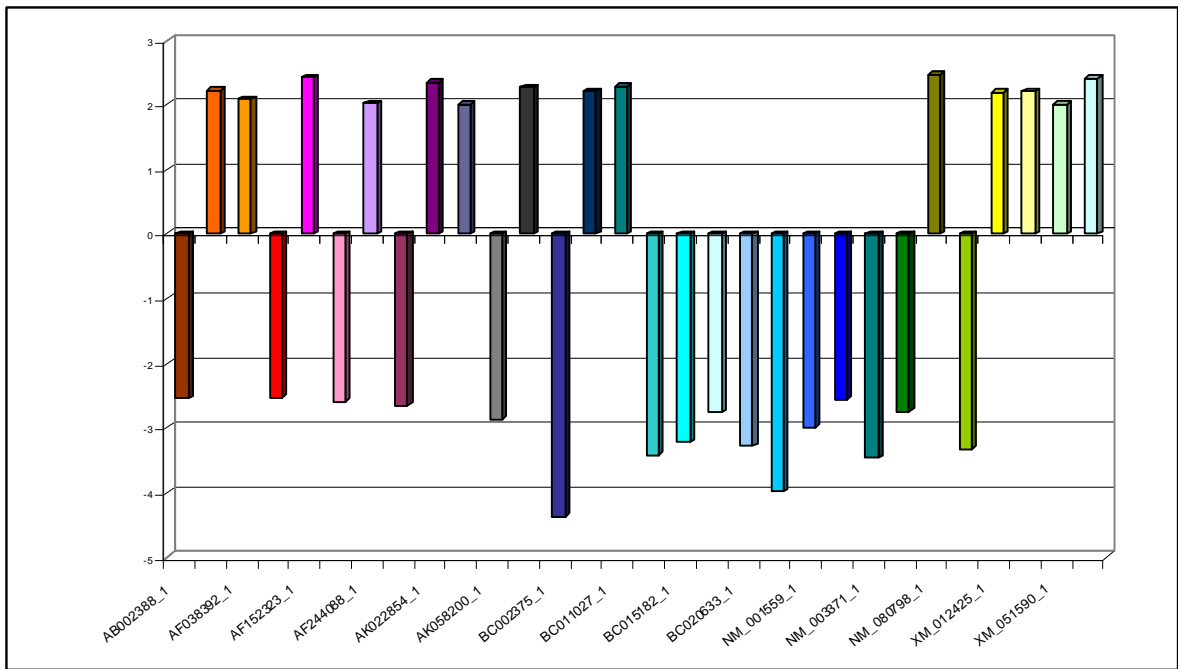
Megbeszélés

Eredményeink alkalmazásával Magyarországon válogatott beteganyagon RNS micro-array technikát alkalmaztunk, melynek eredményei publikálás és interpretálás alatt állnak.

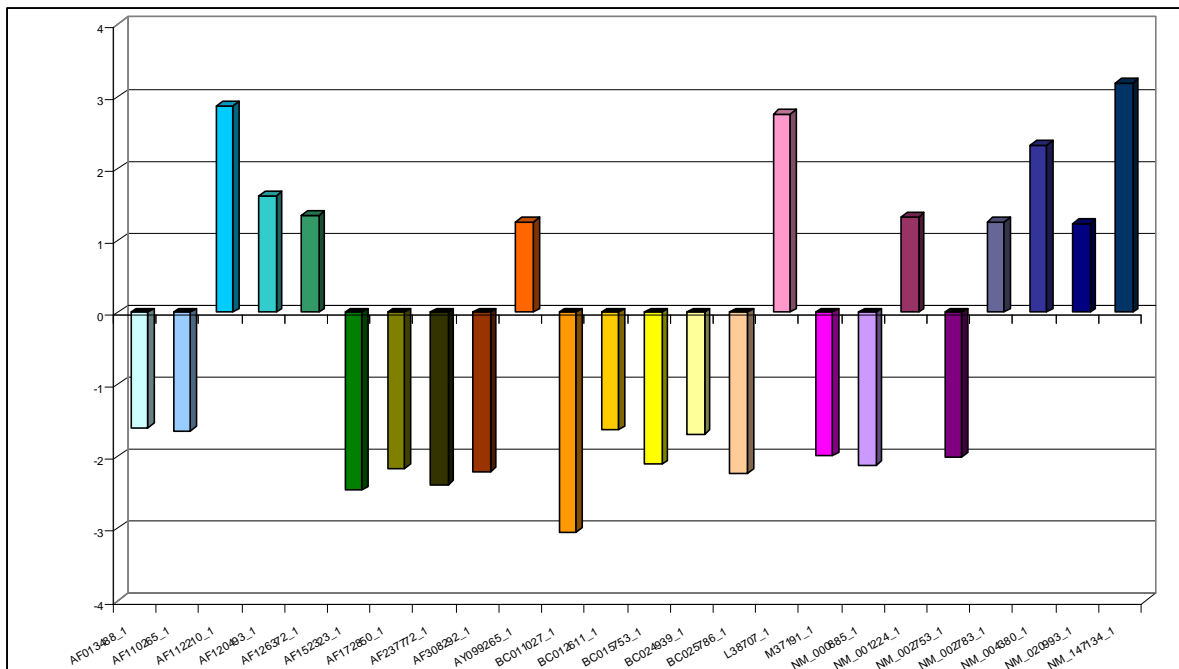
A hagyományos protein és RNS alapú technikáktól az OTKA pályázat felépítésének megfelelően jutottunk el a legkorszerűbb technikához.

Eredményeink ismeretében további célunk, gyakoribb tumorok esetén is egy néhány tucat célgén kiválasztása, amelynek alkalmazásával jobb prevenciót, prognózist, predikciót, progressziót érhetünk el.

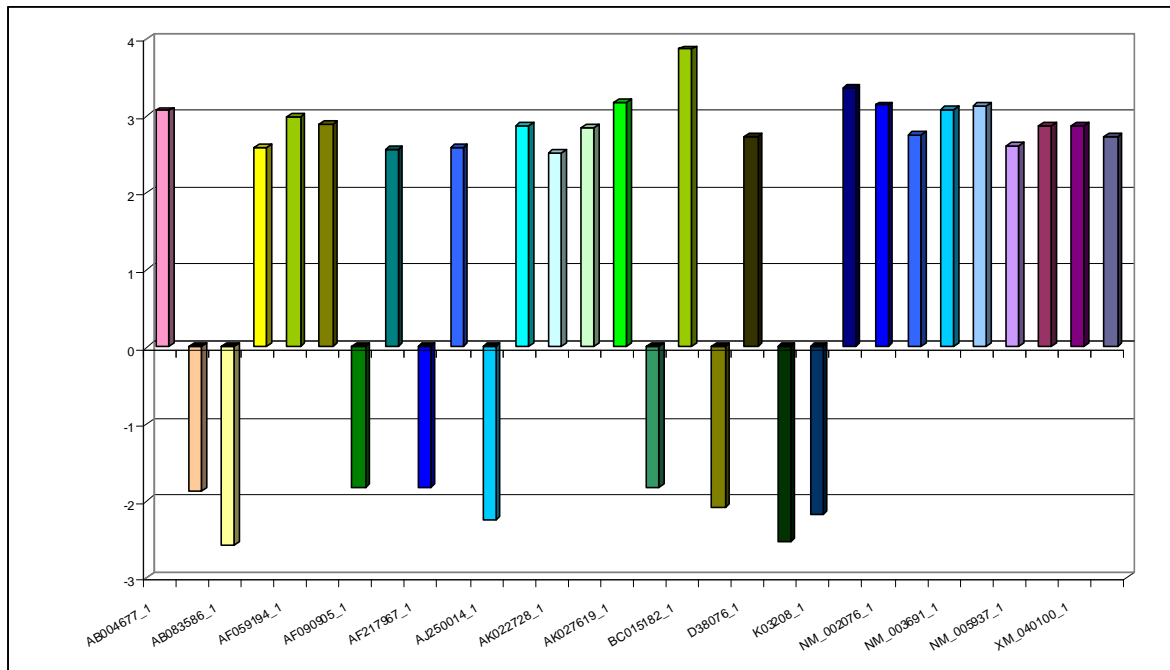
Melléklet



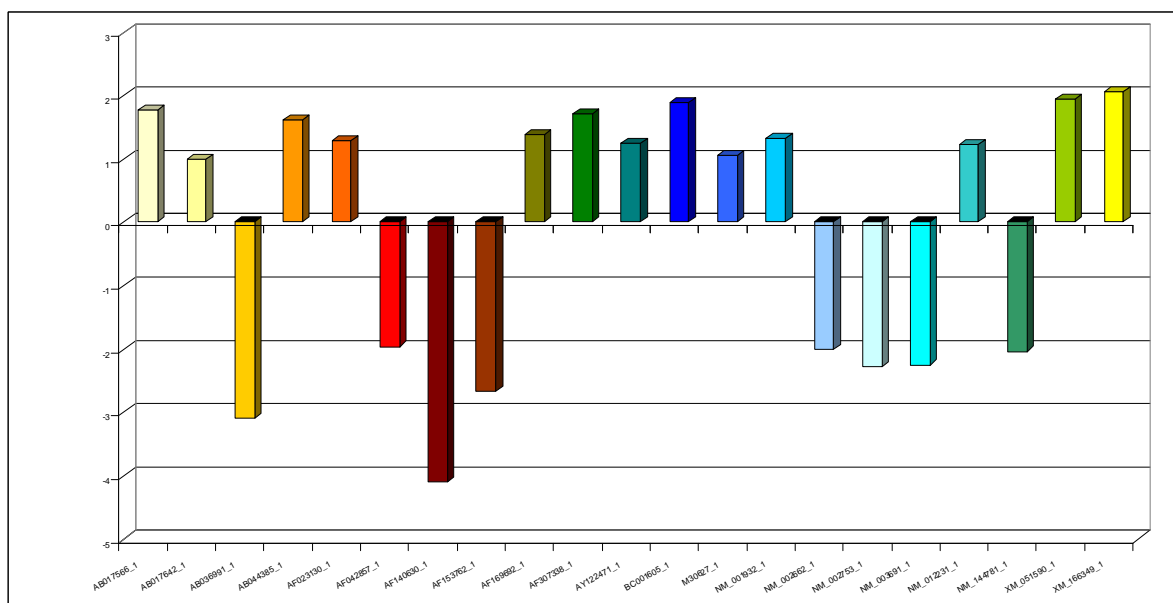
Folikuláris adenoma - normál pajzsmirigy szövet összehasonlítása



Folikuláris adenoma - follikuláris carcinoma szövet összehasonlítása



Papilláris carcinóma - normál pajzsmirigy szövet összehasonlítása



Folikuláris karcinóma - normál pajzsmirigy szövet összehasonlítása

Jelmagyarázat a diagramokhoz

AB002388_1	gi:2224720 - kiaa0390
AB004677_1	gi:2224590 - kiaa0325
AB017566_1	gi:4586379 - lipoyltransferase
AB017642_1	gi:4519628 – oxidative-stress responsive 1
AB036991_1	gi:22831321 - developmentally regulated rna-binding protein 1
AB040528_1	gi:13359304 - mage-e1b

AB044385_1	gi:8439530 - transmembrane molecule with thrombospondin module
AB083586_1	gi:20152235 – putative g-protein coupled receptor
AF013488_1	gi:4758055 - creb binding protein
AF022913_1	gi:2558890 - gpi transamidase
AF023130_1	gi:2522207 - ras-grf2
AF038392_1	gi:3123907 - pre-mrna splicing factor
AF042857_1	gi:2952271 - lung cancer antigen ny-lu-12 variant a
AF059194_1	gi:3068760 - basic-leucine zipper transcription factor mafk
AF087918_1	gi:7144622 – olfactory receptor 17-7
AF090905_1	gi:6690185 - pro0233
AF110265_1	gi:4731317 - elastase 1 precursor
AF112210_1	gi:21322261 - interleukin enhancer binding factor 2
AF120493_1	gi:14790160 - caspase 2, isoform 2 precursor; casp2
AF126372_1	gi:6563207 - heat shock protein hsp70-related protein
AF140630_1	gi:5902613 – urotensin-ii
AF152323_1	gi:4506176 - pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7
AF153762_1	gi:7157918 - bruton's tyrosine kinase
AF160499_1	gi:6651285 - arylsulfatase d beta
AF169692_1	gi:9845484 - protocadherin-9
AF172850_1	gi:606756 - diacylglycerol kinase
AF208694_1	gi:11494011 – impact
AF237772_1	gi:21536441 - b-cell cll/lymphoma 7a
AF244088_1	gi:8453102 - zinc finger protein
AF307338_1	gi:12751138 - b aggressive lymphoma long isoform
AF308292_1	gi:190892 - ras inhibitor
AF308819_1	gi:18027485 - nuclear receptor-interacting factor
AJ250014_1	gi:8250235 – cyld
AK000573_1	gi:7020760 - cdna clone unnamed protein product.
AK022728_1	gi:10434296 - cdna clone unnamed protein product.
AK022854_1	gi:10434489 - cdna clone unnamed protein product.
AK025478_1	gi:10438003 - homo sapiens cdna: flj21825 fis, clone hep01348; unnamed protein product.
AK027159_1	gi:10440217 - homo sapiens cdna: flj23506 fis, clone lng03055; unnamed protein product.
AK027619_1	gi:14042420 - cdna clone moderately similar to putative serine/threonine-protein kinase p78 (ec 2.7.1.-)
AK058200_1	gi:16554280 - cdna clone unnamed protein product.
AK075042_1	gi:22760878 - cdna clone weakly similar to gc-rich sequence dna-binding factor (gcf)
AY099265_1	gi:22212926 - nuclear transcription factor, x-box binding 1 isoform 3; nfx1
AY122471_1	gi:22252913 – defensin beta 118
BC000814_1	gi:12654024 - tg-interacting factor (tale family homeobox)
BC001605_1	gi:12804406 - phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1
BC002375_1	gi:12803142 - similar to tumor protein d52-like 1
BC004470_1	gi:13325315 - unknown (protein for mgc:10332)
BC011027_1	gi:6467370 - thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme
BC011634_1	gi:15079632 - similar to g protein-coupled receptor 30
BC012611_1	gi:15214958 - similar to eukaryotic translation initiation factor 4e
BC015182_1	gi:15929505 - unknown (protein for mgc:10230)
BC015753_1	gi:16041745 - gro2 oncogene
BC017798_1	gi:17389524 - unknown (protein for mgc:22343)
BC020633_1	gi:18088325 - similar to retinol binding protein 4, plasma
BC024939_1	gi:6650598 - epidermal growth factor receptor substrate eps15r

BC025786_1	gi:20986504 – mitogen-activated protein kinase 10, isoform 1; mapk10
D38076_1	gi:534871 - ran-bp1(ran-binding protein 1)
D87465_1	gi:1665814 - kiaa0275
K03208_1	gi:190509 - prb2
L38707_1	gi:5802880 - melanoma antigen
M29548_1	gi:181966 - eef1a
M30627_1	gi:292161 - heat shock protein 86
M37191_1	gi:6006032 - integrin alpha 4 precursor
NM_000885_1	gi:11036541 - gamma-parvin
NM_000946_1	gi:4506050 - primase, polypeptide 1 (49kd); prim1
NM_001224_1	gi:5456935 - protocadherin gamma a3
NM_001559_1	gi:4504642 - interleukin 12 receptor, beta 2; il12rb2
NM_001932_1	gi:21536463 - palmitoylated membrane protein 3
NM_002076_1	gi:4504060 - glucosamine (n-acetyl)-6-sulfatase precursor
NM_002662_1	gi:4505872 - phospholipase d1, phosphatidylcholine-specific; pld1
NM_002753_1	gi:20986504 – mitogen-activated protein kinase 10, isoform 1; mapk10
NM_002783_1	gi:15029639 - similar to leptin receptor gene-related protein
NM_003371_1	gi:4507870 - vav 2 oncogene
NM_003691_1	gi:4505836 - serine/threonine kinase 16
NM_004380_1	gi:19354217 - similar to ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
NM_004380_1	gi:4758055 - creb binding protein
NM_005251_1	gi:4885236 – forkhead box c2
NM_005937_1	gi:5174576 - myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, drosophila); translocated to, 6; mllt6
NM_006484_1	gi:5922000 - dual-specificity tyrosine-(y)-phosphorylation regulated kinase 1b isoform c
NM_012231_1	gi:20336257 - retinoblastoma protein-binding zinc finger protein, isoform a; prdm2
NM_020993_1	gi:2343184 - tubulin folding cofactor b
NM_080798_1	gi:22027567 - alpha 1 type xiii collagen isoform 2
NM_144781_1	gi:21735593 - programmed cell death 2, isoform 2; pcd2
NM_145752_1	gi:22027474 - cdp-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase isoform 2
NM_147134_1	gi:19343998 – retinoic acid- and interferon-inducible protein (58kd)
XM_012425_1	gi:22055334 - similar to lysyl oxidase-like 1
XM_030577_1	gi:22062140 - similar to potential phospholipid-transporting atpase iia
XM_040100_1	gi:15300400 - similar to c35d10.12.p
XM_051590_1	gi:18555980 - similar to nuclear pore protein gp210 precursor - rat
XM_098859_1	gi:22045568 - similar to riken cdna 1700021p10
XM_166349_1	gi:20555078 - similar to nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b-cells inhibitor, epsilon; nfkbie
XM_172494_1	gi:22049660 - similar to nuclear receptor coactivator 4