

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**WARBURG EFFEKTUSBAN SZEREPET JÁTSZÓ MIKRO-RNS-EK, VALAMINT A
HDAC4 ÉS SIRT6 HISZTON DEACETILÁZ ENZIMEK SZEREPE FELNŐTTKORI
HEMATOLÓGIAI MALIGNUS BETEGSÉGEK PATOGENEZISÉBEN**

Dr. Gaál Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László



Debreceni Egyetem

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

WARBURG EFFEKTUSBAN SZEREPET JÁTSZÓ MIKRO-RNS-EK, VALAMINT A HDAC4 ÉS SIRT6 HISZTON DEACETILÁZ ENZIMEK SZEREPE FELNŐTTKORI HEMATOLÓGIAI MALIGNUS BETEGSÉGEK PATOGENEZISÉBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok
tudományágban

Írta: dr. Gaál Zsuzsanna okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája (Élettan és
neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Dr. Ivanics Tamás, PhD
Dr. Szatmári István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára
2017. május 22., 14:15 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Szegedi István, PhD
Dr. Tóth Sára, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Bay Péter, az MTA doktora
Dr. Szegedi István, PhD
Dr. Takács István, PhD
Dr. Tóth Sára, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2017. szeptember 27. (szerda) 13:00 óra

BEVEZETÉS

A tumorokban bekövetkező epigenetikai változásokról közölt első adatok 1983-ból származnak. Mára bebizonyosodott, hogy a génexpressziós mintázatban a DNS szekvenciájának módosulása nélkül bekövetkező változások - melyek érinthetik a DNS-metilációt, a hisztonkódot és a különböző nemkódoló RNS-eket egyaránt - a transzlokációkhoz és molekuláris genetikai eltérésekhez hasonlóan a malignus betegségek, és azon belül a leukémia patogenezisének fontos tényezői. A zavartalan hemopoézishez nélkülözhetetlen az epigenetikai szabályozó mechanizmusok intaktsága, amelyek komplex kisiklását az onkohematológiai kórképekben bizonyítékok egyre növekvő sora támasztja alá. A sejtek metabolizmusának Otto Warburgról elnevezett jellegzetes megváltozása, mely magában foglalja a fokozott glikolízist és laktátképződést, szintén a malignus betegségek jellemző sajátossága. A sejtanyagcsere és az epigenetikai szabályozás megváltozása ugyanakkor egymástól nem élesen elhatárolható, mivel a Warburg effektusban számos epigenetikai mechanizmus játszik szerepet. A metabolizmus és az epigenetika közös sajátossága, hogy az őket érintő változások a citogenetikai és molekuláris genetikai eltérésekkel ellentétben reverzibilisek, ezáltal a beavatkozás lehetősége alapvetően különbözik. Az ezen változásokat célzó terápiás szerek az eddigi adatok szerint eredményesen kombinálhatók mind egymással, mind konvencionális kemoterápiás szerekkel. Az epigenetikai változásokra a reverzibilitás mellett jellemző, hogy a genetikai eltéréseknél gyakran időben korábban bekövetkeznek, és a kromatinállomány szerkezetének módosulása révén következményes genetikai változásokat indukálnak. Az egyes tumorsuppresszor gének, onkogének és transzlokációk révén képződő fúziós onkoproteinek malignus betegség kialakulását gátló vagy elősegítő hatása ugyanakkor rendszerint másodlagosan kialakuló epigenetikai eltérésekhez kötött.

Genetikai és epigenetikai változások tehát együttesen, egymással sokszoros kölcsönhatásban állva járulnak hozzá a génexpressziós mintázatot meghatározó komplex szabályozó hálózat működésének malignus betegség kialakulásához vezető kisiklásához. A jövőben az egyes terápiás szerek kombinációjának megválasztása lehetőség szerint egyénre szabottan, a genetikai, epigenetikai és metabolikus eltérések együttes értékelése alapján kell, hogy történjen, ezáltal növekedhet a túlélők száma, és javulhat a túlélők életminősége.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az epigenetikai szabályozás főbb jellemzői

Az epigenetika első definíciója 1942-ből, Conrad Hal Waddingtontól származik, mely szerint az epigenetika felelős a genotípus fenotípusban történő megnyilvánulásáért. Az első definíció megszületését számos további követte. A 2000 óta leggyakrabban használt, Wolffe és Guschin nevéhez fűződő verzió értelmében az epigenetika mindazon szabályozó mechanizmusokat magába foglalja, melyek nyomán a génexpressziós mintázat a DNS szekvenciájának megváltozása nélkül módosul.

Az epigenetikai módosítások legfőbb típusai a DNS-metiláció, a hiszton modifikáció, a nemkódoló RNS-ek, köztük mikro-RNS-ek által létrejövő génexpressziós változások és a nukleoszóma remodelling. Az epigenetikai markerek fontos sajátossága, hogy örökölheto, ugyanakkor reverzibilis változások. Nagyfokú plaszticitás jellemző rájuk, hiszen a differenciáció és egyedfejlődés során, továbbá környezeti tényezők hatására rendkívül dinamikusan változnak.

DNS-metiláció, -demetiláció és –hidroximetiláció

A DNS-metiláció kovalens módosítás, melynek során DNS metiltranszferáz (DNMT) enzimek S-adenozil-metionin (SAM) molekuláról származó metilcsoportot kapcsolnak a CpG dinukleotidok citozin bázisainak 5' szénatomjához. A DNS-metiláció a transzkripció represszióját eredményezi.

A DNS demetilációja lehet passzív és aktív folyamat. Passzív demetiláció esetén a replikáció során újonnan képződő DNS-szálon elmarad a fenntartó metiláció, míg az aktív demetiláció több lépésben, 5-hidroximetiláción keresztül megvalósuló folyamat. Az 5-hidroximetilcitozin (5-hmC) 5-metilcitozinból (5-mC) történő képződését a TET nevű, háromtagú enzimes család katalizálja. Mivel a TET enzimek kofaktorául szolgáló α -ketoglutarátot az izocitrát dehidrogenáz (IDH) enzimek állítják elő, ezért a DNS-metilációs mintázat szabályozásában az IDH1 és IDH2 közvetetten igen fontos szerepet tölt be.

A TET2 enzimnek kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a hemopoézis epigenetikai szabályozásában. Mutáció révén kialakuló haploinsufficienciája a hemopoetikus őssejtek (HSC) homeosztázisnak felborulásához, önmegújító képességük kóros mértékű fokozódásához vezet. Zavart szenved a hemopoetikus prekursorok differenciációja, és premalignusnak tekinthető sejtklónok jönnek létre.

Hisztón acetiláció és deacetiláció, hisztón deacetiláz és sirtuin enzimek

A hisztón fehérjék struktúrálatlan N-terminális részén bekövetkező kovalens módosítások összességét hisztónkódnak nevezzük. A hisztón acetiltranszferáz enzimek (HAT) által katalizált acetiláció a transzkripció aktivációjához vezet. Az acetilációval szemben a deacetiláció a génexpresszió represszióját eredményezi. A jelenleg ismert 18 különböző hisztón deacetiláz (HDAC) enzimet 4 csoportba soroljuk. A HDAC fehérjék a III-as csoportba tartozó, kofaktorként NAD^+ -ot hasznosító sirtuinok (SIRT) kivételével Zn^{2+} -függő enzimek.

A NAD^+ kofaktort igénylő SIRT enzimek nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a metabolizmus szabályozásában. Közülük a SIRT6 kölcsönhat a glikolitikus gének expressziójáért felelős HIF1 α és c-Myc transzkripciós faktorokkal, ezáltal fontos szerepe van a glikolízis szabályozásában. A vérképzés epigenetikai szabályozásának karmestereként számon tartott TET2 enzimet a hisztón deacetilázok közül a SIRT6 szabályozza, melynek csendesítését követően az 5-hmC szint megnövekedését észlelték. Krónikus limfoid leukémiában (CLL) a SIRT6 up-regulációját detektálták.

Akut mieloid leukémiában (AML) igazolták a HDAC4 kölcsönhatását az FLT3 jelátviteli útvonalához tartozó PRL3 fehérjével. Gyermekkori akut limfoid leukémiában (ALL) a HDAC4 magas expressziós szintje kedvezőtlen prognózist jelez, és prednisonra adott kedvezőtlen terápiás válasszal társul.

Mikro-RNS-ek szerepe a hemopoézis és a karcinogenezis során

A mikro-RNS-ek 19-24 nukleotid hosszúságú, evolúciósan konzervált nemkódoló RNS-molekulák, melyek a génexpressziót poszttranszkripciós szinten szabályozzák.

A mikro-RNS-ek expressziós szintje a hemopoetikus sejtek differenciálódása közben dinamikusan változik, szabályozó szerepük azonban az érett sejtek működésének, funkciójának befolyásolására is kiterjed. A miR-125b a hemopoézis kapcsán egyik legintenzívebben tanulmányozott mikro-RNS. A magas miR-125b expressziós szint igazoltan gátolja a mieloid sejtek differenciációját, ezáltal annak overexpressziója a hemopoetikus sejtek malignus transzformációjának irányába hat. A hemopoézis epigenetikai szabályozásának karmestereként számon tartott TET2 enzim szabályozásában egyéb mikro-RNS-ek mellett a miR-26a szerepét tartják jelentősnek.

Az első bizonyíték, mely mikro-RNS-ek és malignus betegség kialakulása közötti kapcsolatot igazolt, 2002-ből származik, amikor Calin és munkatársai a CLL-es betegek több mint felében deletálódó 13q14-es régióban a tumorsuppresszor tulajdonságú miR-15-öt és miR-16-ot azonosították. Azóta bebizonyosodott, hogy a mikro-RNS-eknek szerepe van a daganatok iniciációjában és progressziójában, továbbá az epithelialis-mesenchymalis tranzíció

szabályozása révén a metasztázisok kialakulása során is. A mikro-RNS expressziós profilokból sok esetben következtetni lehet a tumor típusára és annak stádiumára egyaránt.

A fehérjekódoló génekhez hasonlóan onkogén és tumorszuppresszor tulajdonságú mikro-RNS-ek szintén ismertek, melyeket az irodalomban oncomiR-ként, illetve anti-oncomiR-ként jelölnek. Jól ismert anti-oncomiR a miR-124, mely a CDK6 szabályozása, és ezáltal a kontrollálatlan sejtosztódás gátlása révén fejti ki tumorszuppresszor hatását. A hematológiai malignus betegségekben egyik leginkább up-regulált onkogén tulajdonságú mikro-RNS-ként számon tartott miR-155 a SHIP1 protein foszfatáz down-regulációjáért felelős.

A többi epigenetikai szabályozó mechanizmushoz hasonlóan a leukémia patogenezisében a mikro-RNS-ek is fontos szerepet játszanak. A betegek különböző citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések alapján meghatározott csoportjai esetén jellegzetes mikro-RNS expressziós profilokat azonosítottak. A miR-15 és a miR-16 delécióját vagy down-regulációját a CLL-ben szenvedő betegek 68%-ánál igazolták. AML-ben a miR-125b expressziós szintjének nem kevesebb mint 90-szeres megemelkedése jellemző. Szintén AML-ben pozitív korrelációt észleltek a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám, valamint a miR-30b, miR-30c, miR-155, illetve miR-181b expressziós szintje között.

A mikro-RNS-ek klinikumban történő alkalmazását elősegíti nagyfokú stabilitásuk. A mikro-RNS-ek alkalmazhatók a differenciáldiagnosztika és a prognosztika területén egyaránt, emellett expressziós szintjük módosítása terápiás célokra is felhasználható. Ismert, hogy a mikro-RNS-ek a kemorezisztencia kialakulásához többféle módon is hozzájárulhatnak, ezzel összhangban az expressziós profilok legígéretesebb klinikai alkalmazásának a kezelésre adott válasz előrejelzését tekintik. Előzetes eredmények szerint a mikro-RNS expressziós szintek vizsgálata a jövőben a minimális reziduális betegség megállapításában is segítséget nyújthat.

Epigenetika és metabolizmus kölcsönös egymásra hatása

2010 óta ismert, hogy az intermedier metabolizmus szinte valamennyi enzimének aktivitását befolyásolja a HAT enzimek által katalizált poszttranszlációs acetiláció, melynek mértéke összefüggést mutat az egyes tápanyagok, köztük a glükóz, aminosavak és zsírsavak koncentrációjával. A metabolikus enzimek aktivitásának szabályozásában tehát az epigenetikai módosításokért felelős fehérjék fontos szerepet töltenek be, azonban a metabolizmus is visszhat az epigenetikai szabályozásra, hiszen a különböző epigenetikai markereket létrehozó és eltávolító enzimek túlnyomó többsége metabolit kofaktorokat igényel működéséhez.

A Warburg effektus és annak epigenetikai háttere

Otto Warburg 1920-as években tett megfigyelése szerint a tumorsejtek elegendő oxigén jelenlétében is a fokozott laktátképződést preferálják az oxidatív foszforilációval szemben. Azóta bebizonyosodott, hogy a róla elnevezett, a tumorsejtek megváltozott metabolizmusát jelölő Warburg effektushoz a fokozott glikolízis mellett számos egyéb változás is hozzátartozik.

A glikolízis üteme az egészséges sejtekhez képest akár 200-szoros is lehet, amelyhez a fokozott glükózfelvétel mellett a glikolitikus gének overexpressziója is jelentős mértékben hozzájárul. A fokozott glikolízis során nagy mennyiségben képződő laktátot a tumorsejtek az extracelluláris térbe választják ki. A laktát koncentrációja általában csak lokálisan, a tumoros mikrokörnyezetben emelkedik meg jelentősen.

A glikolízis során egy molekula glükóz felhasználásával az oxidatív foszforilációhoz képest gyorsabban, de lényegesen kevesebb, 36 helyett mindössze 2 ATP-molekula képződik. Az oxidatív foszforiláció háttérbe szorulásának következtében a mitokondriumokban képződő reaktív oxigéngyökök (ROS) mennyisége is jelentős mértékben visszaesik. A HSC sejtek megfelelő differenciációjához azonban a reaktív oxigéngyökök magas szintje szükséges, így annak lecsökkenése a hemopoézis megzavarását eredményezi.

A malignusan transzformálódott sejtekben számos további, az egy szénatomtartalmú csoportok metabolizmusát érintő változást leírtak. A Warburg effektusra a fentiek mellett jellemző az anabolikus folyamatok és a glutaminolízis fokozódása, valamint bizonyos metabolikus enzimek tumorspecifikus izoformáinak expressziója, melyek közül legismertebbek a piruvát kináz M2-es (PKM2), illetve a hexokináz II-es izoformája (HK II). A malignus betegségekből gyakoriak a citrátkör enzimeit érintő mutációk, amelyek által leggyakrabban érintett enzimek hematológiai malignus betegségekből az IDH, szolid tumorokban pedig a fumarát hidratáz (FH) és a szukcinát dehidrogenáz (SDH). Mindhárom esetben α -ketoglutarát analóg molekulák szaporodnak fel, ami kompetitív antagonizmus révén az α -KG-dependens enzimek, köztük az epigenetikai módosításokért felelős TET2 és a Jumonji C domént tartalmazó hiszton demetilázok gátlását eredményezi.

Mára bebizonyosodott, hogy a Warburg effektusban az epigenetikai szabályozó mechanizmusok kisiklása is fontos szerepet tölt be. Közülük legtöbb adat a sirtuin típusú hiszton deacetiláz enzimek, valamint a mikro-RNS-ek metabolizmusra gyakorolt hatásáról áll rendelkezésre.

A SIRT3 a piruvát dehidrogenáz (PDH) enzimkomplex és az intracelluláris ROS szintek szabályozása révén egyaránt ellensúlyozza a Warburg effektust, azonban míg a SIRT4 gátolja, addig a SIRT3 elősegíti a tumorsejtekre jellemző fokozott glutaminolízist. Az anti-Warburg hatása miatt szolid tumorokban tumorszuppresszor tulajdonságúnak tartott SIRT6 kiemelt

szerepet tölt be a sejtek glükóz homeosztázisának epigenetikai szabályozásában. Gátolja a sejtek fokozott glükózfelvételét és a glikolitikus enzimek overexpresszióját.

Az onkogén miR-155 indirekt módon fokozza a hexokináz HK II izoformájának expresszióját. Ezzel szemben a tumorsuppresszor miR-124 gátolja a tumorspecifikus PKM2 izoforma kifejeződését. A c-Myc a glutamináz enzimet represszáló miR-23a és miR-23b gátlása révén segíti elő a malignusan transzformálódott sejtekben a fokozott glutaminolízist. AML-ben szenvedő betegektől származó granulocitákban igazolták, hogy a miR-23b és a miR-26a a ROS scavenger peroxiredoxin III molekula up-regulációjával járul hozzá a Warburg effektushoz. A piruvát dehidrogenáz komplex X nevű komponensének (PDHX) szabályozása által a miR-26a hozzájárul az acetyl-CoA mennyiségének daganatsejtekre jellemző csökkenéséhez, valamint a piruvát és laktát akkumulációjához. A miR-378* a PGC1 β -val kölcsönható ERR γ és GABPA fehérjék gátlása révén a citrátköri enzimek expressziós szintjének csökkenését okozza.

Epigenetikai és metabolikus eltérések jelentősége a leukémia patogenezisében

Mára bebizonyosodott, hogy a malignus betegségek kialakulásának hátterében a génexpressziós mintázatot meghatározó komplex szabályozó hálózat számos elemének egyidejű funkciózavara áll, és a tumorok létrejöttében a genetikai eltérések mellett az epigenetikai változások halmozódása szintén kiemelt jelentőséggel bír.

A különböző epigenetikai mechanizmusok egymás működését kölcsönösen befolyásolják, azonban az egyes epigenetikai szabályozásért felelős enzimek és mikro-RNS-ek nemcsak egymással, hanem a hematológiai malignus betegségekre jellemző fúziós géntermékekkel és a molekuláris genetikai eltérések által érintett fehérjékkel is sokszoros kölcsönhatásban állnak.

Az eddig rendelkezésre álló eredmények alapján leukémiában az epigenetikai és metabolikus eltérések jelenléte sokszor már a citogenetikai és molekuláris genetikai eltéréseket megelőzően észlelhető. Mindez, az epigenetikai és metabolikus változások reverzibilis természetével együttesen a terápiás beavatkozás lehetőségének új szintjét nyitja meg, és egyben jelzi az eltérések lehető leghamarabb történő kimutatásának jelentőségét.

Az epigenetikai és metabolikus támadáspontú szerek kombinációja egymással és konvencionális kemoterápiás szerekkel egyaránt ígéretes lehetőség a hematológiai malignus betegségek kezelésében. AML és ALL sejtvonalakon például a NAD⁺-független hiszton deacetiláz enzimek és a NAD⁺-függő sirtuinok egyidejű gátlása esetén szinergisztikus antileukémiás hatást tapasztaltak. A HDAC és a DNMT enzimek gátlószerei növelhetik a malignusan transzformálódott sejtek fogékonyságát a konvencionális kemoterápiás szerekkel szemben. Ugyanakkor nemcsak az epigenetikai támadáspontú szerek befolyásolhatják a konvencionális terápiás szerek alkalmazásának eredményességét. Bizonyítékok növekvő sora

igazolja, hogy a konvencionális kemoterápiás szerek szerteágazó epigenetikai változásokat indukálnak.

Az eredményesebb kezeléshez feltétlenül szükséges a jelenlegieknél specifikusabban ható és kevésbé toxikus szerek alkalmazása, amely feltételeknek az epigenetikai és metabolikus támadáspontú terápiás szerek sok szempontból megfelelnek, azonban fontos szem előtt tartanunk, hogy a specificitás sokszor ezen esetekben is elégtelen, valamint kemorezisztencia a konvencionális kemoterapeutikumokhoz hasonlóan a célzott terápiás szerekkel szemben is kialakulhat.

CÉLKITŰZÉSEK

A felnőttkori hematológiai malignus betegségekből, elsősorban akut mieloid leukémiában szenvedő betegek csontvelő mintáin végzett Western blot és RT-qPCR vizsgálataink legfőbb céljai az alábbiak voltak:

- (1) NAD^+ -függő és NAD^+ -független hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintje közötti kapcsolat vizsgálata**
- (2) A SIRT6 és a HDAC4 hiszton deacetiláz enzimek patogenetikai szerepének vizsgálata**
- (3) A miR-378*, miR-23b, illetve miR-26a patogenetikai szerepének vizsgálata**
- (4) Hiszton deacetilázok és mikro-RNS-ek expressziós szintjének összehasonlítása a felnőttkori AML különböző alcsoportjaiban**
- (5) Hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintje, valamint a diagnózis idején megállapított klinikai adatok közötti összefüggések vizsgálata**
- (6) Kemoterápia indukálta változások tanulmányozása hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjében**

MÓDSZEREK

Betegek és felhasznált minták

Munkánk során összesen 45, hematológiai malignus betegségben szenvedő felnőtt betegről származó, egyenként 1,5-2 ml mennyiségű, a diagnózis idején EDTA-tartalmú csőbe levett csontvelő mintában határoztuk meg fehérjék, mRNS-ek és mikro-RNS-ek expressziós szintjét. A mintákat BM001-től BM080-ig kódoltuk, és a feldolgozás kezdetéig -20°C-os hőmérsékleten tároltuk. A betegek túlnyomó többsége akut mieloid leukémiában szenvedett (n=32 a fehérjeszintű vizsgálatok esetén és n=27 az RNS-vizsgálatok során). Ezen felül mind a fehérje-, mind az RNS-szintű vizsgálatok során felhasználtuk akut limfoid leukémiában (n=2), kevert fenotípusú akut leukémiában (n=1), mielodiszpláziás szindrómában (n=4), hajás sejtes leukémiában (n=1), illetve csontvelői infiltrációval társuló Hodgkin lymphomában (n=1) szenvedő betegek mintáit. További két minta egyéb típusú malignitásokban szenvedő betegektől származott (BM067: tüdő adenocarcinoma, BM039: mieloid sarcoma), melyek csontvelői érintettség jeleit nem mutatták. Két, FAB M5 altípusú AML-es beteg esetén a diagnózis idején levett minta mellett egy-egy, a kezelés kezdetétől számított 4 hét múlva levett csontvelő minta vizsgálata is megtörtént. A citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések (kariotípus, FLT3-ITD és FLT3-TKD mutáció, az NPM1 gén 12-es exonjában bekövetkező 4 bázispárnyi inszerció), a csontvelői blaszt arány meghatározása, továbbá a perifériás vérkép vizsgálata a rutin diagnosztikai eljárások keretében történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina-, illetve Patológiai Intézetében.

Etikai engedély

A csontvelő minták levétele, tárolása és az azokon végzett valamennyi laboratóriumi vizsgálómódszer végrehajtása a Helsinki Deklarációban foglalt irányelvek szerint, valamint az általunk benyújtott DEOEC RKEB/IKEB 3955-2013 protokoll azonosítójú kutatás Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutásetikai Bizottság által jóváhagyott etikai engedélyében (ETT TUKEB 12497-5/2014 EKV, 115/2014) foglaltak betartásával történt. Ezen engedély nem terjedt ki egészséges önkéntes donoroktól történő csontvelői mintavételre.

Mintapreparálás Western blot analízishez

500 µl mennyiségű, EDTA-tartalmú csőbe levett, a feldolgozásig -20°C-os hőmérsékleten tárolt csontvelő mintát a felolvasztást követően proteáz inhibitor koktélt (PIC) (Sigma, katalógusszám: P8340) tartalmazó lízispufferben lizáltunk, majd szonikáltunk. A minták fehérjetartalmát BCA fehérjemeghatározó reagensek (Life Technologies, katalógusszám:

23225) felhasználásával, 490 nm hullámhosszon történő spektrofotometria segítségével határoztuk meg. Az eredményeket az Origin 8 programmal értékeltük ki. Az így előkészített minták 20-20 µl-es mennyiségeit 2x-es SDS mintapuffer tartalmú oldatban (Sigma, katalógusszám: S3401-10VL) 4 µg/µl koncentrációjúra hígítottuk, és felfőzést követően (ThermoBlock, 10 min, 100°C) további felhasználásig ismételtelen lefagyasztottuk (-20°C).

Western blot analízis és denzitometria

A fentebb írtak szerint előkészített mintákból 50 µg fehérjét tartalmazó mennyiségeket (12,5 µl) vittünk fel 10%-os gélekre SDS poliakrilamid gélelektroforézishez (SDS-PAGE), melyet 120 V feszültség beállításával végeztünk, 90 percig, Dual Color fehérjestandard (BioRad, katalógusszám: 1610374) felhasználásával. Ezt követően a fehérjék nitrocellulóz membránra történő transzferálási lépését 110 V-on hajtottuk végre, szintén 90 percig. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5%-os marhaszérum albumin (BSA) tartalmú oldatban való inkubációval blokkoltuk, 60 percen át. Az alkalmazott primer és szekunder antitestek az alábbiak voltak: anti-HDAC4 (Cell Signaling, katalógusszám: 2072, hígítás: 1:1000), anti-SIRT6 (Cell Signaling, katalógusszám: 8771, hígítás: 1:1000), anti-LAMIN A/C (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-20681, hígítás: 1:1000), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-47724, hígítás: 1:5000), anti-rabbit (Sigma, katalógusszám: A0545, hígítás: 1:7000), anti-mouse (Cell Signaling, katalógusszám: 7076, hígítás: 1:5000). A vizsgált fehérjék molekulatömege: HDAC4: 140 kDa, SIRT6: 42 kDa, LAMIN A&C: 69&62 kDa, GAPDH: 37 kDa. A membránok inkubációját az elsődleges antitestekkel 16 órán keresztül, 4°C-on, a másodlagos antitestekkel 2 órán át, szobahőn végeztük. Az anti-GAPDH kivételével valamennyi elsődleges antitest esetén anti-rabbit másodlagos antitestet alkalmaztunk. Az anti-GAPDH esetén az alkalmazott szekunder antitest anti-mouse volt. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Sustrate (Life Technologies, katalógusszám: 34080) és SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Life Technologies, katalógusszám: 34095) felhasználásával a keletkező kemilumineszcens jeleket a FluorChem FC2 gëldokumentációs rendszer (Alpha Innotech) és az AlphaEase FC szoftver segítségével detektáltuk. Az aspecifikus sávok meghatározása érdekében második antitest kontroll vizsgálatot (anti-rabbit) végeztünk. Denzitometriás analízis céljából az Image J szoftvert alkalmaztuk. A belső kontrollokra (LAMIN A/C, illetve GAPDH) történő normalizálás révén meghatároztuk a vizsgált fehérjék (HDAC4, illetve SIRT6) relatív expressziós szintjét az egyes mintákban. Adott fehérje átlagos relatív expressziós szintjét minden esetben két Western blot vizsgálat eredménye alapján határoztuk meg. A hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban így nyert átlagos relatív expressziós szinteket a

fentebb írt két, csontvelői infiltrációt nem mutató mintában (BM039, BM067) nyert relatív expressziós szintek átlagára normáltuk.

RNS-izolálás és az izolált RNS koncentrációjának meghatározása

Az EDTA-tartalmú csövekbe levett csontvelő minták 500-500 µl-éhez megegyező mennyiségű TRI reagenst adtunk hozzá (Sigma, katalógusszám: T9424), majd kloroform, izopropanol és etanol felhasználásával izoláltuk a teljes RNS-frakciót. Az izolált RNS-t koncentrátor készülékkel (Concentrator plus, Eppendorf) beszártottuk, majd nukleázmentes vízben (NFW) (Lonza, katalógusszám: 51200) reszuspendáltuk. Az izolált teljes RNS-frakció koncentrációját NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer készülék segítségével határoztuk meg, 260 nm hullámhosszon. Az izolált RNS-t további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

Reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz láncreakció

Munkánk során 6 különböző mikro-RNS (miR-124, miR-155, miR-378*, miR-23b, miR-26a) és 2 különböző hiszton deacetiláz enzim (HDAC4, SIRT6) relatív expressziós szintjét határoztuk meg hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiból a fentiek szerint izolált teljes RNS-frakciókban, reverz transzkripció (RT) és kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) segítségével. Referencia génként az irodalomban ajánlott U6 spliceosomal RNS-t alkalmaztuk. Az izolált teljes RNS-frakció koncentrációjától függően 900-1500 ng RNS reverz transzkripcióját végeztük el az Omniscript RT kit (Qiagen, katalógusszám: 205113) segítségével, 20 µl reakciótérfogatban, mely minden esetben tartalmazott 0,25 µl 40 U/µl koncentrációjú RNáz inhibitor (Promega, katalógusszám: N261A). A reverz transzkripciót 60 percig végeztük, 37°C hőmérsékleten. A qPCR reakciókat LightCycler 480 Master készülékkel (Roche) hajtottuk végre, melyek során a mikro-RNS-ek esetén UPL21 próbát (Roche, katalógusszám: 04686942001) és 5 U/µl koncentrációjú Taq polimeráz enzimet (ThermoFisher Scientific, katalógusszám: EP0402), míg a hiszton deacetiláz enzimek és az U6 spliceosomal RNS esetén 2x SYBR Green Mastermixet (Roche, katalógusszám: 04887352001) alkalmaztunk. A qPCR reakciókat minden esetben triplikátumban végeztük, 20 µl reakciótérfogatban, mely a 2x-re hígított RT-termékből 5 µl-t tartalmazott. A qPCR reakciók során alkalmazott hőmérsékleti profil az alábbi volt:

-iniciáció: 3 perc 95°C (1x)

-amplifikáció: 10 sec 95°C, 30 sec 58°C, 1 sec 72°C (45x)

-hűtés: 10 perc 40°C (1x).

A mikro-RNS-ek MirBase adatbázisban megtalálható (www.mirbase.org) szekvenciája alapján szekvenspecifikus stem-loop és forward primereket terveztünk, egy a Czimmerer Zsolt és munkatársai által 2013-ban publikált, online elérhető szoftver segítségével

(www.mirnadesigntool.astridresearch.com). A mikro-RNS-ek relatív expressziós szintjének qPCR segítségével történő meghatározásához univerzális reverz primert alkalmaztunk. A HDAC és SIRT6 mRNS-szintű relatív expressziós szintjének meghatározásához szükséges primereket az online elérhető Universal Probe Library Assay Design Center (www.lifescience.roche.com) segítségével terveztük meg. Az U6 spliceosomal RNS vizsgálatához korábban publikált primerszekvenciákat alkalmaztunk. Az RT-reakciókhoz szükséges stem-loop primereket 100 μ M koncentrációjúra hígítottuk, amely oldatokból a 20 μ l térfogatú reakcióelegyek 0,2 μ l-t tartalmaztak. A mikro-RNS-ek esetén a qPCR során összeállított 20 μ l térfogatú reakcióelegyek a 100 μ M koncentrációjúra hígított forward és univerzális reverz primerekből 0,06 μ l-t tartalmaztak. A HDAC4, SIRT6 és U6 esetén a szükséges primerekből, melyeket 10 μ M koncentrációjúra hígítottunk, 1-1 μ l-t tartalmaztak a szintén 20 μ l térfogatú reakcióelegyek a qPCR során.

A qPCR adatok kiértékelése

Valamennyi qPCR reakciót triplikátumban végeztük. A C_p értékeket a Light Cycler 480 SW 1.5.0 szoftverrel, a relatív kópiaszámot a ΔC_p módszer segítségével határoztuk meg. Az így nyert értékekből triplikátumonként átlagot számítottunk, majd a vizsgált gének és a referenciagén esetén kiszámított átlagértékek hányadosának meghatározásával kaptuk meg a vizsgált gének relatív expressziós szintjét.

Statisztikai analízis, klaszteranalízis és ábratervezés

A statisztikai analízist (Kolmogorov-Smirnov teszt, t-teszt, Mann-Whitney teszt, Pearson-féle korreláció, Spearman-féle rangkorreláció) a SigmaStat 3.0 szoftver segítségével végeztük. A korrelációs koefficiens (r) abszolút értéke szerint nagyon szoros ($0.7 \leq |r| < 1.00$: Pearson, $0.8 \leq |r| < 1.00$: Spearman), szoros ($0.4 \leq |r| < 0.7$: Pearson, $0.6 \leq |r| < 0.8$: Spearman), közepes ($0.3 \leq |r| < 0.4$: Pearson, $0.4 \leq |r| < 0.6$: Spearman), gyenge ($0.2 \leq |r| < 0.3$: Pearson, $0.2 \leq |r| < 0.4$: Spearman), illetve elhanyagolható ($0 \leq |r| < 0.2$: Pearson, $0 \leq |r| < 0.2$: Spearman) korrelációkat állapítottunk meg. Klaszteranalízis céljából a Cluster 3.0 szoftvert, az ábrák tervezéséhez a Java Treeview és a GraphPad Prism 5.00 szoftvereket alkalmaztuk. Az egyes betegcsoportok összehasonlítása esetén az ábrákon feltüntettük a medián értéket és az interkvartilis terjedelmet.

EREDMÉNYEK

Munkánk során hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek diagnózis idején levett csontvelő mintáiban határoztuk meg mikro-RNS-ek, továbbá hiszton deacetiláz enzimek mRNS- és fehérjeszintű expressziós szintjét Western blot analízis és RT-qPCR segítségével.

A HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben

A vizsgált hiszton deacetiláz enzimek belső kontrollra normalizált, relatív expressziós szintjét egy adott beteg csontvelő mintájában relatíve magasnak vagy alacsonynak tekintettük annak függvényében, hogy a teljes vizsgálati anyagban (n=45) meghatározott medián expressziós szintnél magasabbnak vagy alacsonyabbnak bizonyult. Adott betegcsoport esetén a csoport medián expressziós szintjét viszonyítottuk a teljes vizsgálati anyag medián expressziós szintjéhez.

Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim esetén heterogén fehérjeszintű expressziós szinteket észleltünk. Az alábbiakban az eredményeket a diagnózist, illetve a társuló citogenetikai és molekuláris genetikai eltéréseket figyelembe véve tekintjük át.

FAB M0 altípusú AML (n=3) esetén relatíve alacsony, míg FAB M1 altípusú AML (n=1) esetén relatíve magas HDAC4 szintet észleltünk. A három FAB M0 altípusú AML-ben szenvedő beteg közül ketten FLT3-TKD mutációt hordoztak (BM001, BM007), azonban a mutációs státusz és a HDAC4 fehérje expressziós szintje között nem találtunk összefüggést. A FAB M2 altípusú AML-es betegek csoportjában (n=7, relatíve alacsony HDAC4 expressziós szint) három betegnél igazolódott NPM1 mutáció (BM019, BM033, BM068), közülük egy beteg FLT3-ITD mutációt (BM068), egy másik pedig FLT3-TKD mutációt is hordozott (BM019). Közülük az FLT3-TKD mutációt hordozó betegnél a HDAC4 szintje relatíve alacsonynak, míg az FLT3-ITD mutáció esetén relatíve magasnak bizonyult. A FAB M3 altípusú AML-ben szenvedő, a t(15;17) transzlokáció mellett FLT3-ITD és FLT3-TKD mutációt egyaránt hordozó beteg mintájában (n=1, BM061) relatíve magas HDAC4 expressziós szintet kaptunk. A FAB M4 altípusú AML-es csoportba tartozó betegeknél (n=9, relatíve magas HDAC4 expressziós szint) változatos citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések igazolódtak. Ebben a csoportban a komplex kariotípus (BM008), a 18p deléció (BM069), a 8-as kromoszóma triszómiája (BM072) és a 16-os kromoszóma inverziója (BM076) közül a legmagasabb HDAC4 szintet a 18p deléciót hordozó beteg mintájában detektáltuk. A FAB M4 altípusú AML-es csoportba tartozó két, NPM1 és FLT3-ITD mutációt egyaránt hordozó beteg

közül (BM077, BM075) MDS-ből transzformálódott AML esetén (BM077) relatíve magas, míg megelőző MDS hiányában (BM075) relatíve alacsony HDAC4 szintet mértünk. A FAB M4 altípusú AML-es betegek csoportjának egészét tekintve a legmagasabb HDAC4 szintet a normál kariotípus mellett FLT3-ITD mutációt hordozó beteg (BM071) esetén észleltük. Valamennyi FAB altípus közül a FAB M5 altípusú AML-es betegek csoportjában (n=5) bizonyult legmagasabbnak a HDAC4 fehérje medián expressziós szintje. Ezen csoportban magasabb HDAC4 szintet észleltünk a 8-as kromoszóma triszómiája esetén (BM006), mint a 6q deléciójakor (BM002), továbbá a HDAC4 fehérje szintje szintén magasabbnak bizonyult egyidejű FLT3-ITD és NPM1 mutáció esetén (BM040), mint az NPM1 mutáció önálló hordozásakor (BM026). A FAB M6 altípusú AML-ben szenvedő beteg (n=1, BM073) mintájában relatíve alacsony HDAC4 expressziós szintet mértünk.

Az ALL-es felnőtt betegek közül (n=2, relatíve magas medián HDAC4 expressziós szint) a Philadelphia kromoszómát hordozó beteg esetén (BM080) extrém magas HDAC4 szintet detektáltunk. Az MDS-ben szenvedő betegek csoportjában (n=4) a HDAC4 fehérje medián expressziós szintje relatíve alacsonynak bizonyult. Közülük ketten hordoztak citogenetikai eltéréseket, melyek közül magasabb HDAC4 szintet láttunk t(16;16) transzlokáció (BM052) esetén, mint a 9-es kromoszóma inverziójakor (BM015). MPAL (n=1, BM029), valamint csontvelői infiltrációval társuló Hodgkin lymphoma esetén (n=1, BM034) egyaránt relatíve alacsony volt a HDAC4 fehérje expressziós szintje, míg hajás sejtes leukémiában (n=1, BM059) relatíve magas HDAC4 szintet észleltünk.

FAB M0 altípusú AML-ben (n=3) alacsony medián SIRT6 expressziós szintet detektáltunk. A csoportba tartozó két, FLT3-TKD mutációt hordozó beteg (BM001, BM007) közül citogenetikai eltérések hiányában (BM001) relatíve magas, míg 3p deléció, az 5-ös kromoszóma monoszómiája és egy marker kromoszóma egyidejű jelenléte (BM007) esetén relatíve alacsony SIRT6 szintet kaptunk. A FAB M1 altípusú AML-ben szenvedő beteg (n=1) mintájában a SIRT6 fehérje expressziós szintje relatíve magasnak bizonyult. A FAB M2 altípusú AML-es betegek csoportjában (n=7, relatíve magas SIRT6 expressziós szint) öt esetben állt fenn MDS-ből transzformálódott AML, melyek közül a legmagasabb SIRT6 szintet az NPM1 mutációt hordozó beteg (BM033) mintájában észleltük. A fennmaradó két, nem MDS-ből transzformálódott FAB M2 altípusú, kombinált molekuláris genetikai eltéréseket hordozó AML-es beteg közül a SIRT6 fehérje expressziós szintje magasabbnak bizonyult egyidejű NPM1 és FLT3-ITD mutáció esetén (BM068), mint NPM1 és FLT3-TKD mutáció társulásakor (BM019). A FAB M3 altípusú AML-ben szenvedő betegnél (n=1, BM061) relatíve alacsony SIRT6 szintet mértünk. A FAB M4 altípusú AML-es betegek (n=9, relatíve magas

SIRT6 expressziós szint) csoportjában két esetben igazolódott kombinált NPM1 és FLT3-ITD mutáció (BM077, BM075). Közülük MDS-ből transzformálódott betegség esetén (BM077) relatíve magas, míg megelőző MDS hiányában kialakult AML-ben (BM075) relatíve alacsony SIRT6 szintet észleltünk. A fentebb részletezett négy, citogenetikai eltéréseket hordozó, FAB M4 altípusú AML-ben szenvedő beteg (BM008, BM069, BM072, BM076) közül a SIRT6 szintje 18p deléción (BM069) volt a legmagasabb. A HDAC4 fehérjéhez hasonlóan a SIRT6 medián expressziós szintje is FAB M5 altípusú AML-ben (n=5) adódott a legmagasabbnak. Ebben a csoportban egyetlen esetben, az MDS-ből transzformálódott AML-ben szenvedő beteg (BM028) mintájában észleltünk relatíve alacsony SIRT6 szintet. Szintén a FAB M5-ös altípusú AML-es csoportot tekintve, a 6q deléciójával (BM002) összehasonlítva magasabb SIRT6 szintet detektáltunk a 8-as kromoszóma triszómiája esetén (BM006), továbbá a SIRT6 szintje magasabbnak bizonyult NPM1 és FLT3-ITD mutáció társulása esetén (BM040), mint az NPM1 mutáció önálló hordozásakor (BM026). A FAB M6 altípusú AML-ben szenvedő beteg (n=1, BM073) mintájában relatíve alacsony SIRT6 expressziós szintet láttunk.

ALL-ben (n=2), illetve MDS-ben (n=4) egyaránt magas medián SIRT6 expressziós szintet észleltünk. A HDAC4 fehérjéhez hasonlóan a SIRT6 szintje is extrém magasnak bizonyult a Philadelphia kromoszómát hordozó ALL-es beteg mintájában (BM080). MDS esetén a t(16;16) transzlokáció (BM052) a 9-es kromoszóma inverziójához képest (BM015) magasabb SIRT6 expressziós szinttel társult. MPAL (n=1, BM029) és hajás sejtes leukémia (n=1, BM059) esetén relatíve alacsony, míg csontvelői infiltrációval járó Hodgkin lymphomában (n=1, BM034) relatíve magas SIRT6 szintet detektáltunk.

Szoros korreláció a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintje között

A teljes vizsgálati anyagban (n=45), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=32) egyaránt szoros korrelációt észleltünk a NAD⁺-független HDAC4 és a NAD⁺-függő SIRT6 hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintje között (Spearman-féle rangkorreláció, n=45 esetén $r=0.722$, illetve n=32 esetén $r=0.794$).

A HDAC4 és a SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintjének összehasonlítása hematológiai malignus betegségekben szenvedő betegek alcsoportjai között

Az AML különböző FAB altípusait összehasonlítva, mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim medián expressziós szintje a FAB M5-ös altípusú AML-es betegek csoportjában bizonyult a legmagasabbnak.

A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult nem MDS-ből transzformálódott AML esetén (n=21), mint MDS-ből transzformálódott betegségben (n=11) (Mann-Whitney teszt, $p < 0.05$). A HDAC4 fehérjével szemben a SIRT6 medián expressziós szintje az MDS-ből transzformálódott AML-es betegek csoportjában adódott magasabbnak, de ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns.

A HDAC4 és a SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintje egyaránt magasabb volt FLT3-ITD mutációval társuló AML-ben (n=7), mint az FLT3-ITD mutáció hiányában (n=17). Ezen különbség a HDAC4 esetén statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (Mann-Whitney teszt, $p < 0.05$).

Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintje közötti korrelációk vizsgálata

A miR-124, miR-155, miR-125b, miR-378*, miR-23b, miR-26a, valamint a HDAC4 és SIRT6 mRNS-szintű relatív expressziós szintjének meghatározását RT-qPCR segítségével végeztük el. Referenciagénként az U6 spliceosomal RNS-t alkalmaztuk. A vizsgálatok összesen 40 csontvelő mintán történtek, melyek közül 38 újonnan diagnosztizált hematológiai malignus betegségben szenvedő felnőtt betegektől származott, ebből 27 újonnan diagnosztizált AML-es betegektől. 2 további minta levétele a diagnózis megállapítását követően 4 héttel történt. A BM072, BM077, BM074, BM075 és BM076-os kódú csontvelő mintákon RT-qPCR vizsgálat nem történt.

Az egyes mintákban meghatározott relatív expressziós szintek alapján a klaszteranalízis a vizsgált géneket 5 különböző klaszterbe sorolta. Az expressziós szintek között számos statisztikailag szignifikáns pozitív, illetve negatív korreláció igazolódott.

Mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk

A vizsgált három, szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS (miR-378*, miR-23b, miR-26a) relatív expressziós szintje között a teljes vizsgálati anyagban (n=40), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában egyaránt statisztikailag szignifikáns pozitív korreláció igazolódott. Közülük a miR-378* és miR-23b szintje közötti összefüggés bizonyult a legszorosabbnak ($r=0.755$ n=40 esetén, $r=0.846$ n=27 esetén). A második legerősebb összefüggést a miR-23b és miR-26a szintje között észleltük ($r=0.646$ n=40 esetén, $r=0.553$ n=27 esetén), melyet a miR-378* és miR-26a expressziós szintje közötti korreláció erőssége követett ($r=0.582$ n=40 esetén, $r=0.398$ n=27 esetén).

Az ismert onkogén miR-155 és tumorszuppresszor miR-124, valamint a fenti három mikro-RNS (miR-378*, miR-23b, miR-26a) expressziós szintje között szintén igazoltunk szignifikáns pozitív és negatív korrelációkat.

A miR-155 a vizsgált három, szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS közül legerősebb pozitív korrelációt a miR-378* szintjével mutatott ($r=0.748$ $n=40$ esetén, $r=0.621$ $n=27$ esetén), melyet a teljes vizsgálati anyagban a miR-155 és miR-26a szintje közötti pozitív korreláció erőssége ($r=0.582$ $n=40$ esetén), míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-155 miR-23b-vel mutatott korrelációjának erőssége követett ($r=0.493$ $n=27$ esetén). Az észlelt pozitív korreláció a teljes vizsgálati anyagban a miR-155 és miR-23b expressziós szintje között ($r=0.575$ $n=40$ esetén), míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-155 és miR-26a szintje között bizonyult a leggyengébbnek ($r=0.491$ $n=27$ esetén).

A tumorsuppresszor miR-124 expressziós szintje statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt mutatott a teljes vizsgálati anyagban a miR-26a ($r=-0.539$ $n=40$ esetén), valamint a miR-23b ($r=-0.357$ $n=40$ esetén), míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-26a expressziós szintjével ($r=-0.643$ $n=27$ esetén).

A mieloid sejtek differenciációjának szabályozásában fontos szerepet játszó miR-125b expressziós szintje a Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek közül szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a teljes vizsgálati anyagban ($n=40$) a miR-378* ($r=0.749$), a miR-23b ($r=0.681$) és a miR-26a ($r=0.422$) szintjével egyaránt, míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ($n=27$) a miR-125b, valamint a miR-378* ($r=0.700$) és a miR-23b ($r=0.582$) szintje között igazolódott hasonló összefüggés. A teljes vizsgálati anyagban emellett kimutattuk, hogy a miR-125b és az onkogén miR-155 expressziós szintje között szintén szignifikáns pozitív korreláció áll fenn ($r=0.520$ $n=40$ esetén).

A HDAC4 és mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk

A teljes vizsgálati anyagban ($n=40$) a HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje a vizsgált mikro-RNS-ek mindegyikének szintjével statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott. A Warburg effektussal összefüggésbe hozott mindhárom vizsgált mikro-RNS szintje pozitívan korrelált a HDAC4 szintjével. Az összefüggés erősségének csökkenő sorrendje az alábbi volt: miR-378* ($r=0.734$) > miR-26a ($r=0.675$) > miR-23b ($r=0.596$). Pozitív korreláció igazolódott továbbá a HDAC4 és a hemopoézis szabályozásában fontos szerepet betöltő miR-125b ($r=0.481$), valamint a HDAC4 és az onkogén miR-155 ($r=0.633$) szintje között, míg a HDAC4 szintje a tumorsuppresszor miR-124 expressziós szintjével negatívan korrelált ($r=-0.411$). Az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ($n=27$) szintén pozitív korrelációt észleltünk a HDAC4, illetve mindhárom Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS expressziós szintje között. Az összefüggés erősségének csökkenő sorrendje a következő volt: miR-26a ($r=0.703$) > miR-

378* ($r=0.629$) > miR-23b ($r=0.474$). Szintén pozitív korreláció igazolódott a HDAC4 és az onkogén miR-155 expressziós szintje között ($r=0.407$).

A SIRT6 és mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk

A SIRT6 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje mind a teljes vizsgálati anyagban ($n=40$), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ($n=27$) pozitívan korrelált a Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-26a szintjével ($r=0.514$ $n=40$ esetén, $r=0.487$ $n=27$ esetén), míg a SIRT6 és a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintje között negatív korreláció igazolódott ($r=-0.398$ $n=40$ esetén, $r=-0.573$ $n=27$ esetén).

Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének korrelációja a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszámmal hematológiai malignus betegségekben

A hematológiai malignus betegségek diagnózisának időpontjában megállapított klinikai adatok közül a fehérvérsejtszám több általunk vizsgált gén expressziós szintjével is statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott. Mindkét hiszton deacetiláz enzim esetén negatív korreláció igazolódott ($r=-0.364$ a HDAC4 esetén, $r=-0.351$ a SIRT6 esetén), míg a vizsgált mikro-RNS-ek közül a fehérvérsejtszámmal a miR-124 szintje pozitívan ($r=0.349$), a miR-26a expressziós szintje pedig negatívan ($r=-0.384$) korrelált.

A vizsgált mikro-RNS-ek, valamint a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintjének összehasonlító elemzése hematológiai malignus betegségek esetén, és azon belül az akut mieloid leukémia egyes alcsoportjai között

A vizsgált mikro-RNS-ek, valamint a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintjét összevetettük egymással a teljes vizsgálati anyagban ($n=40$) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ($n=27$) egyaránt, emellett összehasonlítottuk azokat mind a különböző hematológiai malignus betegségekben, mind az AML különböző alcsoportjaiban, melyeket FAB altípus, illetve molekuláris genetikai eltérések szerint különböztettünk meg. Az összehasonlító elemzés során számos statisztikailag szignifikáns különbség igazolódott.

Az onkogén miR-155 expressziós szintje a tumorszuppresszor miR-124 szintjénél szignifikánsan magasabbnak bizonyult a teljes vizsgálati anyagban ($n=40$), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ($n=27$) egyaránt.

A vizsgált három, szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS (miR-378*, miR-23b, miR-26a) közül mind a teljes vizsgálati anyagban ($n=40$), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ($n=27$) a miR-26a expressziós szintje volt legmagasabb, melyet a miR-23b szintje követett.

A hemopoetikus őssejtek mieloid irányú differenciációjának szabályozásában fontos szerepet betöltő miR-125b expressziós szintje a miR-378* és miR-23b szintjénél magasabbnak, míg a miR-26a és a miR-155 szintjénél alacsonyabbnak bizonyult a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt.

A vizsgált két hiszton deacetiláz enzim közül a SIRT6 mRNS-szintű expressziós szintje mind a teljes vizsgálati anyagban (n=40), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) a HDAC4 szintjénél szignifikánsan magasabbnak bizonyult.

A vizsgált három, Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS (miR-378*, miR-23b, miR-26a) expressziós szintje az AML egyes FAB altípusai közül összességében az M0 (n=3) és M3 (n=1) csoportokban bizonyult legmagasabbnak, míg az M6 (n=1) altípusban a legalacsonyabbnak. A mieloid sejtek differenciációját overexpresszió esetén megzavaró miR-125b medián expressziós szintje az M3-as altípusban (n=1) volt legmagasabb. Az M6-os altípus (n=1) esetén észleltük a tumorszuppresszor miR-124 legmagasabb és az onkogén miR-155 legalacsonyabb medián expressziós szintjét.

Az AML-től különböző hematológiai malignus betegségeket tekintve a Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek legmagasabb medián expressziós szintjét hajás sejt leukémia (n=1), illetve kevert fenotípusú akut leukémia (n=1) esetén észleltük, míg a legalacsonyabb szinteket ALL (n=2) és csontvelői infiltrációval társuló Hodgkin lymphoma (n=1) esetén láttuk. Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű medián expressziós szintje ALL (n=2) esetén bizonyult a legalacsonyabbnak.

A mieloid irányú differenciáció szabályozásáért felelős miR-125b expressziós szintje az NPM1 mutációt nem hordozó AML-es betegek csoportjában (n=13) szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az NPM1 mutációt hordozók körében (n=6) (Mann-Whitney teszt, $p < 0.05$).

A tumorszuppresszor tulajdonságú miR-124 esetén az újonnan diagnosztizált AML-es betegek FAB M5 altípusában (n=5) szignifikánsan magasabb expressziós szintet észleltünk, mint a FAB M2 csoportban (n=7) (Mann-Whitney teszt, $p < 0.05$).

Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének változása FAB M5 altípusú AML kezelésének első négy hetében

Két, az AML FAB M5-ös csoportjába tartozó beteg esetén (BM006, BM026) a diagnózis idején levett minták mellett a fenti vizsgálatokat a kezelés megkezdésétől számított négy hét múlva ismételtén levett csontvelő mintákon (BM064, BM055) is elvégeztük. Mind a Western blot analízis, mind az RT-qPCR során változásokat észleltünk az expressziós szintekben, melyek négy esetben voltak a két mintapár esetén megegyező irányúak. Mindkét vizsgált

hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintjében csökkenést észleltünk a diagnózis idejéhez képest, míg a SIRT6 mRNS-szintű expressziója és a miR-26a szintje növekedést mutatott.

MEGBESZÉLÉS

A hematológiai malignus betegségek kialakulásának hátterében a génexpressziós mintázatot meghatározó, genetikai és epigenetikai tényezőket egyaránt magába foglaló, komplex szabályozó hálózat megváltozott működése áll. A sikeres kezelés esélyének növelése érdekében nélkülözhetelen ezen szabályozó hálózat minél több elemének megismerése, azaz a betegség patogenezisének lehető legpontosabb ismerete. Munkánk során hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjét vizsgáltuk hematológiai malignus betegségekben, elsősorban akut mieloid leukémiában szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban, Western blot analízis és RT-qPCR segítségével.

In vitro vizsgálatok eredményei szerint a NAD^+ -függő és NAD^+ -független hiszton deacetiláz enzimek egyidejű gátlása szinergisztikus antileukémiás hatást eredményez, ugyanakkor betegmintákban a hiszton deacetilázok ezen két, eltérő kofaktor szerint megkülönböztetett csoportjába tartozó enzimek szintjét még nem vetették össze. Jelen ismereteink szerint a hiszton deacetilázok közül a Warburg effektus ellensúlyozásában a fokozott glikolízis gátlása révén a SIRT6 tölti be a legjelentősebb szerepet. A SIRT6 emellett igazoltan szabályozza a hemopoézis epigenetikai szabályozásának főszereplőjeként számon tartott TET2 enzimet. A NAD^+ -független HDAC enzimek közül AML-ben igazolódott a HDAC4 kölcsönhatása az FLT3 jelátviteli útvonalához tartozó PRL3 fehérjével, míg gyermekkori ALL-ben a magas HDAC4 expressziós szint kedvezőtlen prognózissal társul. Mind a SIRT6, mind a HDAC4 potenciális onkogén, illetve tumorsuppresszor szerepéről ellentmondásos adatokat közöltek a szolid tumorok különböző típusaiban.

A HDAC4 és SIRT6 enzim fehérjeszintű expressziós szintje között erős pozitív korrelációt igazoltunk mind a teljes vizsgálati anyagban, mind az újonnan diagnosztizált AML-es felnőtt betegek csoportjában. A legmagasabb medián HDAC4 és SIRT6 expressziós szintet egyaránt az AML FAB M5 altípusában, valamint az AML-től különböző betegcsoportok közül ALL-ben tapasztaltuk.

A HDAC4 és SIRT6 fehérjeszintű expressziós szintje között a diagnózis idején levett csontvelő mintákban kimutatott szoros korreláció igazolja a két enzim szinergisztikus szerepét a felnőttkori hematológiai malignus betegségek, és azon belül az akut mieloid leukémia patogenezise során, valamint utal a NAD^+ -függő és NAD^+ -független HDAC enzimek egyidejű

gátlásának szükségességére leukémiában. Az észlelt heterogén expressziós szintek alapján vélhetően a kombinált gátlás antileukémiás hatásának erőssége eltérő lenne a hematológiai malignus betegségek különböző típusai esetén.

MDS-ből transzformálódott AML esetén a HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, mint megelőző MDS hiányában. Ezzel szemben a SIRT6 fehérje szintje éppen az MDS-ből transzformálódott AML-es betegek csoportjában volt magasabb, ugyanakkor ez utóbbi különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. FLT3-ITD mutáció esetén mindkét fehérje expressziós szintje magasabbnak bizonyult, mint az AML-es betegek FLT3-ITD eltérést nem hordozó alcsoportjában, mely különbség szintén a HDAC4 esetén volt szignifikáns. Ez utóbbi megfigyelés alátámasztja a HDAC4 FLT3-ITD mutációval társuló AML-ben betöltött patogenetikai szerepét.

Fehérjeszintű vizsgálataink eredményei prognosztikai következtetések levonására nem alkalmasak, azonban a HDAC4 és SIRT6 enzimek expressziós szintjének heterogenitása felhívja a figyelmet a citogenetikai, molekuláris genetikai, illetve epigenetikai eltérések együttes értékelésének jelentőségére. A különböző hiszton deacetiláz enzimek valószínűleg a leukémia patogenezisének más-más szakaszán töltnek be jelentősebb szerepet, attól is függően, hogy milyen kölcsönhatásban állnak a genetikai eltérések nyomán képződő fúziós onkoproteinekkal, illetve a mutációk által érintett fehérjékkel.

RNS-vizsgálataink során a hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek diagnózis idején nyert csontvelő mintáiban a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintje mellett meghatároztuk a tumorszuppresszor miR-124, az onkogén miR-155, a mieloid sejtek differenciációjának szabályozásáért felelős miR-125b, illetve a szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378*, miR-23b és miR-26a relatív expressziós szintjét.

A szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378*, miR-23b és miR-26a expressziós szintje pozitívan korrelált egymással, az onkogén miR-155 és a hemopoézist szabályozó miR-125b szintjével, míg negatív korrelációt igazoltunk a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintjével. Mindez a leukémia patogenezisében betöltött szerepüket támasztja alá. Eredményeink alapján a miR-23b szolid tumorokban észlelt metabolikus hatásai közül hematológiai malignus betegségekben vélhetően a Warburg effektust elősegítő, nem pedig az azt gátló hatása a jelentősebb. A miR-155 és miR-125b szintjével észlelt pozitív, valamint a miR-124 szintjével kimutatott negatív korreláció alapján a miR-378*, miR-23b és miR-26a overexpressziója feltehetően kedvezőtlen prognózist jelez, ennek megerősítésére azonban további vizsgálatok szükségesek. Tisztázni szükséges továbbá, hogy a

leukémia patogenezisében betöltött szerepükhöz a szolid tumorokban megállapított metabolikus hatásaik milyen mértékben járulnak hozzá.

A SIRT6 mRNS-szintű expressziós szintje negatívan korrelált a tumorszuppresszor miR-124 szintjével, míg pozitív korreláció igazolódott a miR-26a expressziójával. Utóbbi nagy valószínűséggel nem metabolikus hatások következménye, hiszen a SIRT6 a fokozott glikolízis gátlása által anti-Warburg hatást fejt ki, míg a miR-26a ezzel ellentétben a PDHX, illetve peroxiredoxin III szabályozása révén elősegíti azt. A pozitív korrelációra magyarázatul szolgáló közös vonás a hemopoézis során kiemelt jelentőségű TET2 enzim szabályozása, mivel a SIRT6 és a miR-26a up-regulációja egyaránt a TET2 enzim gátlását, és a hemopoézis következményes megzavarását eredményezi. Eredményeink alapján hematológiai malignus betegségekben, és azon belül akut mieloid leukémiában a SIRT6 metabolikus hatásánál jelentősebb a hemopoézisre a TET2 enzim szabályozása által kifejtett hatása. A tumorszuppresszor miR-124 szintjével észlelt negatív korreláció felveti a SIRT6 onkogén tulajdonságát leukémiában, valamint a SIRT6 up-regulációjának a betegség kedvezőtlen kimenetelével való társulását, amit a jövőben utánkövetéses vizsgálatok során tanulmányozni szükséges. Mindez ellentétes a SIRT6 szolid tumorok számos típusában feltételezett tumorszuppresszor tulajdonságával, felveti azonban annak lehetőségét, hogy bizonyos hiszton deacetiláz enzimek a szolid tumorokkal összehasonlítva ellentétes tumorszuppresszor vagy onkogén tulajdonsággal rendelkezhetnek.

A HDAC4 mRNS-szintű expressziós szintje pozitívan korrelált a vizsgált három, Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS, az onkogén miR-155 és a mieloid sejtek differenciációját szabályozó miR-125b expressziójával, míg negatív korrelációt észleltünk a tumorszuppresszor miR-124 szintjével. Ez alapján felvetődik a HDAC4 felnőttkori AML-ben betöltött onkogén szerepe, és a magas HDAC4 szint társulása a betegség kedvezőtlen kimenetelével, ami összhangban áll a gyermekkori ALL-ben tett megfigyelésekkel. Mindennek megerősítésére a SIRT6-hoz hasonlóan utánkövetéses tanulmányok szükségesek. Tisztázni szükséges továbbá, hogy a HDAC4 hematológiai malignus betegségek patogenezisében betöltött szerepéhez hozzájárulnak-e, és ha igen milyen mértékben, a Warburg effektust elősegítő metabolikus hatások.

Hematológiai malignus betegségekben nyert eredményeink arra utalnak, hogy vizsgált két hiszton deacetiláz enzim közül a HDAC4 patogenezisben betöltött szerepéhez valószínűbb a Warburg effektussal összefüggő metabolikus hatások hozzájárulása, míg a SIRT6 esetén a hemopoézisre kifejtett hatás tűnik jelentősebbnek.

Az onkogén miR-155 szintje mind a teljes vizsgálati anyagban, mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában szignifikánsan magasabbnak bizonyult a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintjénél, ami a méréseink pontosságát támasztja alá.

A szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek közül a miR-26a szintje szignifikánsan magasabb volt a miR-378* és a miR-23b szintjénél a teljes anyagban és az új AML-es felnőtt betegek körében egyaránt. A miR-26a expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a teljes vizsgálati anyagban a miR-155 szintjénél, továbbá mind a teljes vizsgálati körben, mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-125b expressziós szintjénél. A miR-26a magas medián expressziós szintjét magyarázhatja, hogy míg a miR-125b a hemopoézis megzavarásával, a miR-378* és miR-23b pedig feltehetően a Warburg effektus elősegítésével járul hozzá a patogenezishez, addig a miR-26a a Warburg effektus elősegítése mellett a TET2 enzim szabályozásán keresztül a hemopoézis megzavarása révén is hozzájárul a betegség kialakulásához.

A két vizsgált hiszton deacetiláz enzim közül a SIRT6 mRNS-szintű expressziós szintje a HDAC4 szintjénél szignifikánsan magasabbnak adódott a teljes vizsgálati körben, illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában egyaránt, a SIRT6 up-regulációját CLL-ben pedig már korábban igazolták. Mindezek alapján a hematológiai malignus betegségek patogenezisében a SIRT6 overexpressziója vélhetően nagyobb jelentőséggel bír, mint a HDAC4 up-regulációja.

A miR-125b expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult az NPM1 mutáció hiányában, mint NPM1 mutációval társuló AML esetén, amely megfigyelés arra utal, hogy a miR-125b overexpressziójának a mieloid sejtek differenciációját megzavaró hatása hozzájárulhat az NPM1 mutációt nem hordozó AML-es betegek ismerten kedvezőtlen prognózisához.

Az AML egyes FAB altípusait összehasonlítva a miR-125b medián expressziós szintje az M3 alcsoportban volt legmagasabb, míg a második legmagasabb értéket a differenciálatlan M0 csoportban észleltük, amely eredményeink alapján a miR-125b-nek a hemopoetikus sejtek differenciációjára kifejtett hatása az M3 és M0 FAB altípusok patogenezise során a legjelentősebb. A miR-124 esetén szignifikánsan magasabb expressziós szintet mértünk FAB M5 típusú AML-ben, mint a FAB M2 alcsoportban. Erre magyarázatul szolgálhat, ha a miR-124 tumorszuppresszor hatása a magasabb expressziós szint ellenére is csak kevésbé érvényesül a FAB M5 csoportban, az AML M2 altípusával összehasonlítva. A vizsgált három, Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS közül a miR-378* és miR-26a esetében a legmagasabb, míg a miR-23b esetén a második legmagasabb medián expressziós szintet láttuk

az AML FAB M0 alcsoportjában, továbbá mindhárom mikro-RNS medián expressziós szintje FAB M6 altípusú AML esetén bizonyult legalacsonyabbnak. Mindezek alapján vélhetően az AML különböző FAB típusai közül a miR-378*, miR-23b és miR-26a összességében az AML M0-s FAB altípusának patogenezise során tölt be legfontosabb, míg az M6-os csoportban a legkevésbé jelentős szerepet. Ellentétben ezen FAB altípus kedvezőtlen prognózisával, az M6-os alcsoportban volt legalacsonyabb az onkogén miR-155, míg a legmagasabb a tumorsuppresszor miR-124 medián expressziós szintje. Összhangban az AML FAB M2 és M5 altípusának összehasonlítása során nyert, fentebb részletezett eredményekkel, a miR-124 medián expressziós szintje a kedvezőbb prognózisú FAB altípusokban jellemzően alacsonyabb volt, míg a kedvezőtlen kimenetellel társuló FAB csoportokban magasabbnak bizonyult, ezért azt tartjuk valószínűnek, hogy a miR-124 tumorsuppresszor tulajdonsága részben a társuló citogenetikai eltérések függvényében érvényesül nagyobb vagy kisebb mértékben.

Az AML-től különböző hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegeknel észlelt expressziós szinteket egymással összevetve a szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott, mindhárom vizsgált mikro-RNS első és második legmagasabb medián expressziós szintjét is kivétel nélkül MPAL vagy HCL esetén kaptuk, ami alapján a miR-378*, miR-23b és miR-26a az MPAL és a HCL patogenezise során feltehetően fontosabb szerepet tölt be, mint az MDS, az ALL, illetve a csontvelői infiltrációval társuló HL kialakulása során.

A miR-378*, miR-23b és miR-26a hematológiai malignus betegségekben észlelt heterogén expressziós szintje összhangban áll azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a leukémia különböző típusaiban a jelentős részben epigenetikai tényezők által szabályozott Warburg effektus más-más eleme lehet hangsúlyosabb.

Vizsgálataink során a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám negatívan korrelált a HDAC4 mRNS, SIRT6 mRNS és miR-26a szintjével, míg pozitív korreláció igazolódott a tumorsuppresszor miR-124 expressziós szintjével. Nem észleltük azonban az irodalomban korábban közölt, a miR-155 és a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám között fennálló pozitív korrelációt. Ennek oka lehet a rendelkezésünkre álló alacsony mintaszám mellett a kísérletek során alkalmazott eltérő metodika is. A laboratóriumi módszerek standardizációja a jövőben szükséges lenne, hiszen ezáltal a kutatási eredmények jobban összevethetőek lennének, és kevesebb ellentmondásos eredmény születne például a megváltozott mikro-RNS expressziós szintek prognosztikai vonatkozásait tekintve.

Jelenleg nem ismert, hogy a betegség patogenezise során a mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének módosulása vagy a fehérvérsejtszám változása

következik be hamarabb. Az epigenetikai változások az eddigi irodalmi adatok szerint sokszor a hematológiai malignus betegségek korai stádiumában alakulnak ki, így a megváltozott expressziós szintek potenciálisan a leukémia fokozott kockázatának biomarkereiként lehetnek alkalmazhatóak.

Ismert, hogy egyes konvencionális kemoterápiás szerek is indukálhatnak epigenetikai változásokat. Vizsgálataink során két FAB M5 altípusú AML-es betegnél a diagnózis idején levett csontvelő minták mellett a vizsgálati panelben szereplő mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjét a kezelés megkezdését négy héttel követően ismételt levett mintákban is tanulmányoztuk. A kezelés első négy hetében a HDAC4 és a SIRT6 enzimek fehérjeszintű expressziós szintje egyaránt csökkent, míg a SIRT6 mRNS és a miR-26a szintje növekedett. Az expressziós szintekben a kezelés során bekövetkező változások kimutatásának talán legfontosabb potenciális klinikai alkalmazása a kezelés folytatására adott terápiás válasz előrejelzése lehet.

Munkánk során nem prognosztikai, hanem a patogenezist érintő következtetések levonására törekedtünk. Elsőként vizsgáltunk és igazoltunk NAD^+ -függő és NAD^+ -független hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintje közötti korrelációt hematológiai malignus betegségekben. Eredményeink alátámasztják a Warburg effektussal szolid tumorokban összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek patogenetikai szerepét ezen betegségcsoportban. Vizsgálataink felvetik mind a SIRT6, mind a HDAC4 onkogén szerepét felnőttkori AML-ben. Az AML egyes alcsoportjai között több esetben is szignifikáns különbségeket igazoltunk a vizsgált gének expressziós szintjében. Új megfigyeléseket tettünk az epigenetikai eltérések és klinikai adatok közötti összefüggések vizsgálata, valamint a konvencionális kemoterápiás kezelés következtében kialakuló epigenetikai változások tanulmányozása során.

A jövőben nélkülözhetetlen az epigenetikai eltérések és a hematológiai malignus betegségek kimenetele közötti összefüggések megállapítására irányuló prospektív vizsgálatok végzése mellett a különböző citogenetikai, molekuláris genetikai, epigenetikai és metabolikus eltérések együttes értékelése, amely által lehetővé válhat egy a jelenleginél árnyaltabb prognosztikai rendszer kidolgozása. Az egyénre szabott, epigenetikai és metabolikus támadáspontú szereket egyaránt magában foglaló terápia lehető legkorábbi stádiumban történő megkezdése elősegíti mind a túlélési aránynak, mind a túlélők életminőségének a javulását.

ÖSSZEFOGLALÁS

A hematológiai malignus betegségek patogeneziséhez igazoltan hozzájárulnak a DNS-metilációs mintázatban, a hisztonkódban, illetve a mikro-RNS-ek expressziós szintjében bekövetkező változások, továbbá a malignusan transzformálódott sejtek metabolizmusának Warburg effektusként ismert, jellegzetes átalakulása.

Munkánk során hematológiai malignus betegségekben, elsősorban AML-ben szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban vizsgáltuk mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjét. Erős pozitív korrelációt észleltünk a glikolízis és a hemopoézis szabályozásáért egyaránt felelős SIRT6, valamint a gyermekkori ALL-ben kedvezőtlen kimenetellel összefüggésbe hozott HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje között, ami a NAD^+ -függő és NAD^+ -független hiszton deacetiláz enzimek szinergisztikus szerepét jelzi a patogenezisben. A szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378*, miR-23b és miR-26a expressziós szintje pozitívan korrelált egymással, a hemopoézis szabályozásában jelentős miR-125b és az onkogén miR-155 szintjével, valamint negatívan a tumorszuppresszor miR-124 szintjével. Ezen eredményeink a miR-378*, miR-23b és miR-26a felnőttkori hematológiai malignus betegségek patogenezisében betöltött szerepét igazolják. Pozitív korrelációt észleltünk a SIRT6 mRNS és a miR-26a szintje között, továbbá a HDAC4 mRNS expressziós szintje pozitívan korrelált a miR-378*, miR-23b, miR-26a, miR-125b és a miR-155 szintjével. Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje negatívan korrelált a tumorszuppresszor miR-124 szintjével. Mindezek alapján a SIRT6 és a HDAC4 onkogén szerepe egyaránt felvetődik. Közülük a HDAC4 patogenezisben betöltött szerepéhez valószínűbb a Warburg effektust elősegítő metabolikus hatások hozzájárulása, míg a SIRT6 esetén vélhetően nem a metabolizmusra, hanem a hemopoézisre kifejtett hatás a jelentősebb. A diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszámmal több vizsgált gén expressziós szintje is korrelált. A FAB M5 altípusú AML kezelésének első négy hete során mind a vizsgált hiszton deacetiláz enzimek, mind a mikro-RNS-ek expressziós szintjében változásokat észleltünk, melyek legfontosabb potenciális klinikai alkalmazása az alkalmazott kezelés eredményességének előrejelzése lehet. A vizsgált gének expressziós szintjének az AML egyes alcsoportjai közötti összehasonlítása során statisztikailag szignifikáns különbségeket állapítottunk meg.

Az epigenetikai és metabolikus változások citogenetikai és molekuláris genetikai eltérésekkel történő együttes értékelése által a jövőben létrejöhet egy árnyaltabb prognosztikai rendszer, mely a személyre szabott kezelés elősegítésével a terápiás eredmények javulásához vezethet.

FŐBB ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

(1) Erős pozitív korrelációt igazoltunk a SIRT6 és a HDAC4 hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintje között, mellyel elsőként bizonyítottunk pozitív összefüggést NAD⁺-függő és NAD⁺-független hiszton deacetiláz enzimek expressziója között hematológiai malignus betegségekben.

(2) Erős pozitív korrelációt mutattunk ki a miR-378*, miR-23b és miR-26a szintje között, mely mikro-RNS-eket szolid tumorokban a Warburg-típusú metabolizmussal hozták összefüggésbe. Expressziós szintjük emellett korrelált az irodalomból jól ismert tumorsuppresszor, onkogén, illetve a hemopoézis szabályozásáért felelős mikro-RNS-ek szintjével.

(3) A hemopoézis epigenetikai szabályozásáért felelős TET2 enzimet szabályozó SIRT6 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje pozitívan korrelált a TET2 enzim szabályozásában szintén részt vevő miR-26a szintjével.

(4) A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje szoros korrelációt mutatott a leukémia patogenezisében igazoltan szerepet játszó, tumorsuppresszor, onkogén, illetve a hemopoézis szabályozásáért felelős mikro-RNS-ek expressziós szintjével.

(5) Az akut mieloid leukémia egyes alcsoportjai között több esetben is szignifikáns különbségeket észleltünk a vizsgált hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjében.

(5/1) A HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a nem mielodiszpláziás szindrómából transzformálódott akut mieloid leukémiában szenvedő betegek csoportjában, mint mielodiszpláziás szindrómából történt transzformáció esetén.

(5/2) A HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az FLT3-ITD mutációt hordozó akut mieloid leukémiás betegek csoportjában, mint ezen mutáció hiányában.

(5/3) Az akut mieloid leukémiás betegek NPM1 mutációt nem hordozó csoportjában a miR-125b szignifikánsan magasabb expressziós szintjét észleltük, mint az NPM1 mutációt hordozók körében.

(5/4) A tumorsuppresszor miR-124 expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult FAB M5, mint FAB M2 típusú akut mieloid leukémiában.

(6) A hematológiai malignus betegségek diagnózisának idején megállapított fehérvérsejtszám negatívan korrelált a HDAC4 mRNS, a SIRT6 mRNS, illetve a miR-26a expressziós szintjével, míg a miR-124 szintjével pozitív korreláció igazolódott.

KULCSSZAVAK

hematológiai malignus betegségek, akut mieloid leukémia, hemopoézis, epigenetika, DNS-metiláció, DNS-hidroximetiláció, hisztonkód, hiszton deacetiláz enzimek, sirtuinok, mikro-RNS-ek, metabolizmus, Warburg effektus, célzott terápia



Nyilvántartási szám: DEENK/93/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gaál Zsuzsanna
Neptun kód: JHJSK8
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gaál, Z.**, Oláh, É., Rejtő, L., Bálint, B. L., Csernoch, L.: Expression Levels of Warburg-Effect Related microRNAs Correlate with each Other and that of Histone Deacetylase Enzymes in Adult Hematological Malignancies with Emphasis on Acute Myeloid Leukemia.
Pathol. Oncol. Res. 23 (1), 207-216, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-016-0151-9>
IF: 1.94 (2015)
2. **Gaál, Z.**, Oláh, É., Rejtő, L., Erdődi, F., Csernoch, L.: Strong Correlation between the Expression Levels of HDAC4 and SIRT6 in Hematological Malignancies of the Adults.
Pathol. Oncol. Res. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-016-0139-5>
IF: 1.94 (2015)





További közlemények

3. Raskó, I., Oláh, É., **Gaál, Z.**: A karcinogenezis genetikája.
In: Klinikai genetika. Szerk.: Oláh Éva, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 353-382, 2015.
4. Vincze, J., Jenes, Á., Fűzi, M., Almássy, J., Németh, R., Szigeti, G., Dienes, B., **Gaál, Z.**, Szentesi, P., Jóna, I., Kertai, P., Paragh, G., Csernoch, L.: Effects of fluvastatin and coenzyme Q10 on skeletal muscle in normo- and hypercholesterolaemic rats.
J. Muscle Res. Cell Motil. 36 (3), 263-274, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-015-9413-5>
IF: 2.071
5. **Gaál, Z.**, Oláh, É.: Epigenetikai szabályozó mechanizmusok és zavarai leukémiában.
Magyar Onkol. 58 (2), 99-107, 2014.
6. **Gaál, Z.**, Oláh, É.: Mikro-RNS-ek és szerepük hematológiai malignus betegségekből.
Orvosi Hetilap. 153 (52), 2051-2059, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29511>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: **5,951**

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,88

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.11.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Csernoch László Intézetigazgató, Rektorhelyettes Úrnak, hogy a kutatómunkához szükséges feltételeket számomra biztosította.

Köszönöm Prof. Dr. Balla György Intézetigazgató, Akadémikus Úrnak a disszertáció megírásához nyújtott hasznos tanácsokat, továbbá hogy a PhD képzést levelező tagozaton, a Gyermekklinika közösségéhez tartozva, csecsemő- és gyermekgyógyász központi gyakornokként fejezhettem be.

Köszönöm Dr. Rejtő László Tanár úrnak, hogy a kísérletek elvégzéséhez nélkülözhetetlen betegmintákat a kutatómunka kezdetétől fogva rendelkezésemre bocsátotta.

Köszönöm Prof. Dr. Oláh Éva és Prof. Dr. Erdődi Ferenc professzoroknak, valamint Dr. Bálint Bálint László Adjunktus Úrnak, hogy támogattak a hallgatóként megkezdett kutatómunka során, és a kísérletek elvégzéséhez szükséges laboratóriumi háttérrel az Orvosi Vegytani Intézetben és a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központjában számomra biztosították.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet Jelátviteli Laboratórium, valamint a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központ jelenlegi és volt munkatársainak, legfőképpen Dedinszki Dórának és Kerekes Tamásnak, hogy a kutatómunkám során alkalmazott molekuláris biológiai módszerek elsajátításában önzetlenül a segítségemre voltak.

Munkám a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 pályázat támogatásával jött létre.

ÖNÁLLÓ MUNKA JEGYZÉKE

Munkám során minden vizsgálati lépést önállóan végeztem el, valamennyi betegminta esetén. Az egyes munkafolyamatok az alábbiak voltak:

a vizsgálati panel és a kutatási terv összeállítása; az etikai engedély tervezetének elkészítése; a betegek klinikai adatainak összegyűjtése; a csontvelő minták előkészítése Western blot analízishez és RNS-izoláláshoz; az alkalmazott primerek szekvenciájának megtervezése; Western blot analízis; denzitometria; RNS-izolálás; az izolált RNS koncentrációjának meghatározása; reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz láncreakció; a qPCR adatok kiértékelése; statisztikai analízis; a disszertáció alapjául szolgáló közlemények teljes terjedelmének megírása