

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A WT1 gén kópiaszám-eltéréseinek és expressziós
zavarainak szerepe daganatos kórképekben**

Dr. Buglyó Gergely

Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015.

A WT1 GÉN KÓPIASZÁM-ELTÉRÉSEINEK ÉS EXPRESSZIÓS ZAVARAINAK SZEREPE DAGANATOS KÓRKÉPEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Buglyó Gergely általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Oláh Éva, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
Prof. Dr. Raskó István, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

DE ÁOK Humánagenetikai Tanszék tárgyalója
2014. október 6. 10 óra,

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
Prof. Dr. Oláh Éva, az MTA doktora
Prof. Dr. Raskó István, az MTA doktora
Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja és helyszíne:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. szeptember 2. 11 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. A WT1 gén és fehérje, izoproteinek

A WT1 gén terméke egy rendhagyó transzkripciósfaktor, amely a kromoszomális és celluláris környezettől függően egyaránt képes aktiválni vagy gátolni bizonyos gének transzkripcióját. A fehérje C-terminálisan négy Zn-ujj doménre, N-terminálisan pedig egy prolinban és glutaminban gazdag szakaszra osztható.

A WT1 fehérje TATA nélküli, GC-gazdag promoterekhez kötődik. Konkrét targetjei között többnyire olyan géneket találunk, amelyek a vese, a szív és a gonádok embryonális fejlődésében játszanak szerepet.

A WT1 funkciójának komplexitása jelentős részben a rendkívül nagyszámú fehérjevariánsnak köszönhető. 1991-ben írták le a 4 alapvető izoformát: 2 helyen lehetséges alternatív *splicing*, ennek megfelelően az érett mRNS-be bekerülhet, vagy abból kimaradhat az 5. exon által kódolt 17 aminosav, ill. a 9. exon által kódolt szakaszból egy KTS tripeptid. Később még több izoproteinről számolt be az irodalom, jelenleg legalább 36-ra tehető a lehetséges variánsok száma. Az adatok azonban az sugallják, az összes izoprotein közül a KTS-pozitív és KTS-negatív formák közötti különbségnek lehet a legjelentősebb élettani szerepe.

A KTS szekvencia beékelődése a fehérje 3. és 4. Zn-ujj doménje közé flexibilissé teszi a linker régiót, és gyengíti a 4. Zn-ujj interakcióját a DNS-sel. Ennek megfelelően a DNS-hez való közvetlen kötődésben elsősorban a KTS-negatív izoprotein játszik szerepet. Számos bizonyíték szól viszont amellet, hogy a WT1 nem pusztán transzkripciósfaktorként működik, hanem fehérje-RNS és fehérje-fehérje interakciók révén, poszttranszkripció szinten is szabályozza targetjeit, e szabályozásban pedig a KTS-pozitív izoformáé a főszerep.

1.2. A gén szerepe az embryonális fejlődésben

A WT1 több fejlődési folyamatot is szabályoz, ezek közül a nemi differenciálódásban játszott szerepét említjük elsőként. Az Sf1 promotert aktiválva létrehozza és fenntartja az indifferens gonádelepet. Az Sf1, vagy a KTS-negatív WT1 hiányában csíkgonád jön létre. Másrészt, a WT1 kiváltja az SRY gén expresszióját, és azon keresztül a Sox9, majd a MIS

termelődését, így végső soron elengedhetetlen a Müller-cső elsorvadásához, a férfi irányú differenciálódáshoz.

A gén terméke a vese fejlődését is több ponton szabályozza: szükséges a még indukálatlan mesenchyma túléléséhez, a mesenchyma-epithelium tranzícióhoz, valamint az azt követő nephronképződéshez, a podocyták létrejöttéhez és megfelelő működéséhez. A kardiovaszkuláris rendszerben ugyanakkor a fehérje látszólag ezzel ellentétesen működik. Itt az EPDC-k expresszálják a WT1-et: ezek a sejtek csak akkor differenciálódnak fibroblasttá vagy izomsejtté, ha a WT1-expresszió megszűnik. A megfigyelés magyarázata, hogy a WT1 képes két irányban szabályozni a WNT4 transzkripcióját: a vesében egy koaktivátorral, a CBP-vel vagy a p300-zal alkot komplexet, az epicardiumban viszont egy korepresszorhoz, a BASP1-hez kötődik.

1.3. A WT1 jelentősége daganatos betegségekben

Az urogenitális rendszerben a WT1 klasszikus tumorszupresszorként viselkedik: ha mindkét kópia kiesik vagy működésképtelenné válik, Wilms-tumor alakul ki. Más daganatokban azonban, ahol a WT1 onkogén szerepe gyanítható, jellemzően ektópiás génexpresszióról van szó, mutáció nélkül. Kivételt képeznek a leukemiák, hiszen ezek hátterében heterozigóta mutációkat is leírtak a vad típusú WT1 expressziója mellett.

Ahogy fent láttuk, a WT1 működhet mind a mesenchyma-epithelium, mind az epithelium-mesenchyma átmenet mediátoraként különböző szövetekben. Ez lehet az egyik lehetséges magyarázat arra, hogyan funkcionálhat egyazon gén tumorszupresszorként a vesében, de onkogénként a szervezet egyéb területeiről származó daganatokban.

Noha az orvosi köztudatban a WT1 úgy él, mint a Wilms-tumorért felelős lokusz, valójában a gén csak az összes daganat 20 százalékáért felelős, és a sporadikus Wilms-tumorról diagnosztizált betegek mindössze 2 százaléka hordoz *germline* WT1 mutációt. Ha azonban a daganat nem önállóan, hanem egy szindróma részeként jelentkezik, gyakrabban találunk a lokuszt érintő elváltozásokat.

A WAGR szindróma Wilms tumor, aniridia, urogenitális rendellenesség vagy gonadoblastoma, valamint mentális retardáció együttesét jelenti, amelyhez gyakran egyéb tünetek társulnak. Hátterében régóta ismert a 11p13 kromoszomális régió heterozigóta deléciója, amely érinti a WT1 és PAX6 géneket.

A Denys-Drash szindróma igen ritka kórkép. Központi tünete a korai veseelégtelenségbe torkolló diffúz mesangialis sclerosis, melyhez Wilms-tumor vagy pszeudohermafroditizmus társul. A szindrómát különböző pontmutációk okozhatják a WT1 génben: legtöbbször a 2., ill. 3. Zn-ujj domént kódoló 8. vagy 9. exon érintett. Az idáig összegyűlt kísérletes bizonyítékok arra utalnak, hogy a kórképben zavart szenved a podocyták érése, epitheliális differenciálódása.

A Frasier szindróma jellemzői a férfi pszeudohermafroditizmus, csíkgonád vagy diszgenetikus herék, melyekből gonadoblastoma indulhat ki. Kialakulhat progresszív glomerulonephropathia, ám itt a lassabban progrediáló FSGS a tipikus tünet. A betegség hátterében a 9. intron mutációja áll, amely a WT1 alternatív *splicing*jának zavarát, a KTS-pozitív és -negatív izoformák arányának megbomlását eredményezi.

A hematológiai megbetegedések közül elsősorban akut leukemiákban, valamint MDS-ben vizsgálták a WT1-expresszió kórélettani és prognosztikai jelentőségét. Mindössze két évvel a gén első leírása után már közölték, hogy mind AML-ben, mind ALL-ben kimutatható a WT1 expressziója a betegek többségében, ugyanakkor krónikus leukemiákban csak blasztos krízis alatt fejeződik ki a gén. Később a WT1-et expresszáló AML-es esetek kapcsán rosszabb prognózisról számolt be a szakirodalom.

Jelenleg a WT1-expressziót a remisszió elérése utáni minimális reziduális betegség markereként használják a klinikumban, főként AML-es betegeknél. ALL-ben több bizonytalanság övezi a génexpresszió markerként való használhatóságát, míg a lymphomák esetében csak igen kevés közlemény áll rendelkezésre a WT1 gén kifejeződéséről és annak szerepéről. Noha több szerző is felhívta rá a figyelmet, hogy érdemes lenne behatóbban foglalkozni a WT1 és a lymphomák kapcsolatával, e terület máig háttérbe szorul a leukemia-kutatás mögött.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk során klinikai kooperációban vizsgáltunk olyan eseteket, ahol egy-egy daganatos betegség háttérében gyanítható volt a WT1 gén szerepe. Konkrét projektjeinket és az azok kapcsán kitűzött célokat az alábbiakban ismertetem.

1. Részben a Denys-Drash szindrómára emlékeztető, ám atípusos klinikai tünetegyüttes háttérében álló WT1-rendellenesség kimutatása.

2. Igazolni a gyanút, hogy a WT1 eltéréseivel kapcsolatos klinikai szindrómákban az orvosi irodalom túlságosan sematikus képet vázol fel. Másképp fogalmazva, a WT1 molekuláris defektusainak palettája olyan sokszínű, hogy az esetek jelentős részében a klinikai kép nem felel meg egyetlen klasszikus diagnózisnak sem.

3. A WT1-expresszió vizsgálata hematológiai betegségekben, qRT-PCR segítségével. Kiemelt célunk volt annak leírása, hogy az expresszió milyen gyakran mutatható ki az ilyen szempontból mindezidáig alig vizsgált non-Hodgkin lymphomákban.

4. Adatok szolgáltatása arra vonatkozóan, hogy a WT1-pozitivitás hogyan befolyásolja a prognózist különböző non-Hodgkin lymphomák esetében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgált betegek

Az egyik vizsgált beteg (Cs. Cs.) vérmintája a DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinikájáról érkezett, ahol vesebiopsziája FSGS-t igazolt. Cs. Cs. 30 éves férfi. Családi anamnézisében szerepeltek olyan adatok, amelyek az urogenitális rendszer örökletes megbetegedését valószínűsítették. A beteg interszex külső genitáliákkal született, majd több, különböző eredetű daganatos betegségben szenvedett élete során (ALL, Wilms-tumor, kisagyi angioblastoma).

A kutatás során vérmintákat vetettünk a betegből és közvetlen családtagjaiból. Először atípusos Denys-Drash vagy Frasier szindróma irányában végeztünk vizsgálatokat (meghatároztuk a WT1 exonok, valamint a relevánsnak tartott intronszakasz szekvenciáját), majd WT1 kópiaszám-analízist, valamint immunfestést végeztünk a WT1-re.

A vizsgált betegek másik csoportja malignus hematológiai megbetegedésekben, non-Hodgkin lymphomában vagy ALL-ben szenvedett. 2007 márciusa és 2012 májusa között összesen 53 betegtől kaptunk vérmintákat, amelyekből meghatároztuk a WT1 expresszióját, majd statisztikai módszereket alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk a WT1-pozitivitás és a prognózis összefüggéseit.

3.2. DNS izolálás, PCR reakció a WT1 exonjainak vizsgálatára

A vérmintából történő DNS izolálást GenElute Blood Genomic DNA Kit-tel (SIGMA) végeztük, majd hagyományos PCR reakció (40-45 ciklus) segítségével egyenként szaporítottuk fel az egyes WT1 exonokat, a környező intronszakaszokkal együtt.

A PCR-es amplifikálást követően a terméket 2 százalékos agaróz gélen futtattuk, majd a várt DNS fragmentumnak megfelelő méretű sávot UV-fényben, borotvapengével kivágtuk a gélből. Ebből a DNS-t Q-BIOgene – BIO 101 Systems GeneClean Kittel visszaizoláltuk, és elküldtük szekvenálásra a Szegedi Biológiai Kutatóközpont DNS Szekvenáló Laboratóriumába.

3.3. Kópiaszám-vizsgálatok, immunfestés

A WT1 gén kópiaszám-analíziséhez qRT-PCR-t (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System), valamint a kópiaszám mérésére kifejlesztett *assay*-ket használtunk (TaqMan Copy Number Assay, Applied Biosystems). Kontrollként az RNáz P *assay*-t alkalmaztuk.

A WT1 gén két végét (1. és 10. exon) külön akartuk vizsgálni, azonban egyik megrendelt *assay* sem bizonyult megbízhatónak az 1. exonhoz, így e helyett az 1. intron kópiaszámát mértük. A WT1 mellett a környező gének (PAX6, EIF3M) kópiaszámát is meghatároztuk, hogy be lehessen határolni egy esetleges delécio vagy duplikáció kiterjedését.

Az immunhisztokémiai jelölést a WT1 C-terminális epitópját felismerő nyúl poliklonális antitest, a WT1 C19 (Santa Cruz Biotechnology) segítségével végeztük. A vizsgált minták Cs. Cs. gyermekkori Wilms-tumorából, valamint 30 éves korában vett (FSGS-t mutató) vesebiopsziájából készült formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) preparátumok voltak.

3.4. RNS izolálás, a WT1-expresszió meghatározása

RNS izolálásra PAXgene Blood RNA Kiteket használtunk. Az izolált RNS koncentrációját NanoDrop segítségével megmértük, majd az RNS-en rövid időn belül reverz transzkripciót végeztünk High Capacity cDNA Reverse Transcription Kittel (Applied Biosystems).

A cDNS mennyiségét az adott génre specifikus primerpárral és TaqMan próbával, qRT-PCR segítségével detektáltuk. A WT1 mellett itt is szükség volt egy referenciagénre: az irodalomból a GAPDH-t választottuk. A további számításokhoz nem a Ct értékeket használtuk, hanem egy standardizált numerikus értéket, amely a 10^4 db GAPDH mRNS-re jutó WT1 mRNS molekulák számát adja meg. Azt a *cut-off* értéket, amely felett WT1-pozitívnak tekintettük az egyes mintákat, 35 egészséges kontrollszemélytől vett minta alapján határoztuk meg.

A betegeket diagnózis alapján osztottuk csoportokba. Ezeken belül különböző alcsoportokat határoztunk meg a WT1 mért expressziója alapján, majd Kaplan-Meier görbéken ábráztuk a teljes és betegségmentes túlélést. A görbék lefutása között tapasztalt különbség szignifikanciáját lograng-próbával vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. WT1 defektus kimutatása komplex daganatos kórkép háttérében

Az atípusos kórkép, melyet Cs. Cs. esetében észleltek a klinikusok, vagy a szokásosnál enyhébb fokú, későbbi kezdetű glomerulonephritisszel járó Denys-Drash szindrómára, vagy olyan Frasier szindrómára utalt, amely gonadoblastoma helyett Wilms-tumort okozott.

A WT1 exonokban, valamint a Frasier szindrómáért felelősnek tartott intronszakaszban azonban nem találtunk eltérést, így a következő lépésben azt vizsgáltuk, nem állhat-e kópiaszám-eltérés a kórkép háttérében. Az eredmények azt mutatták, hogy Cs. Cs. esetében a teljes WT1 gén deletálódott (ám a delécio nem terjed ki a WT1-et körülvevő génekre), míg húga extra kópiával rendelkezik a gén 5' szakaszára nézve. A szülőkben, valamint Cs. Cs. embryonális carcinomával operált bátyjában nem találtunk eltérést.

Két FFPE mintát jelöltünk WT1 elleni antitesttel: a Cs. Cs. 1978-as, trifázisos Wilms-tumorából származó mintát, valamint a másik veséjéből vett frissebb mintát, mely FSGS-t mutatott. Az újabb mintában a WT1-pozitivitás normális mintázatát észleltük, mely a nem daganatos vesére jellemző: kizárólag a podocyták expresszálták a WT1-et. Említésre méltó azonban, hogy csak igen alacsony fokú pozitivitást láttunk, és a sejtmagi területek egyáltalán nem festődtek az antitesttel.

Cs. Cs. klinikai fenotípusát összevetve a kutatás során talált genotípussal, meglehetősen erőltetettnek tűnik a Denys-Drash vagy a Frasier szindróma diagnózisa. Két lehetőség adódik tehát: vagy úgy soroljuk be a beteg fenotípusát, mint a Denys-Drash/Frasier spektrum egy atípusos manifestációját, vagy kibővítve e spektrumot, a deléciós szindrómával (WAGR) azonos csoportba tartozó kórképként határozzuk meg Cs. Cs. betegségét. Meglátásunk szerint mind a klinikai kép, mind a molekuláris vizsgálatok eredményei az utóbbi elképzelést támogatják.

A talált fenotípus (Wilms-tumor és férfi pseudohermafroditizmus megléte aniridia, mentális retardáció és obezitás nélkül) jól beilleszthető abba a képbe, amely az eddig közölt adatok alapján kirajzolódik a régió fontosabb génjeinek szerepéről. Úgy tűnik, hogy az irodalomban ismert WAGR és WAGRO szindrómákat nem különálló entitásként kell kezelnünk, hanem leírhatunk egy szélesebb deléciós spektrumot a 11p13 és 11p14.1

kromoszomális régiók területén. E spektrumon belül a mi esetünk a központi gén, a WT1 izolált delécióját képviseli, az annak megfelelő fenotípussal.

Cs. Cs. betegségében talán az a legszokatlanabb, hogy egyetlen betegnél többfajta malignitás (ALL, Wilms-tumor, angioblastoma cerebelli) jelentkezett. Ismeretes persze, hogy a gyermekkori daganatos betegségek kezelése később másodlagos tumorokat eredményezhet, de (saját közleményünket kivéve) nincs nyoma olyan esetnek az irodalomban, ahol a leukémia jelentkezett először, és ezt követte a Wilms-tumor. Az akut leukémiák bizonyos eseteit összefüggésbe hozták strukturális WT1 defektusokkal, egy esetben pedig WAGR szindrómás betegben is kimutatták a megmaradt WT1 allélt érintő mutációt AML háttérében; ezek alapján úgy tűnik, a Cs. Cs. esetében megfigyelt malignitásokért inkább a WT1 deléciója, és az emiatt fennálló daganatos predispozíció lehet felelős, mintsem a kemoterapeutikumok.

Az irodalmi adatok szinte teljes hiányában nehéz megmondani, hogy vajon a WT1 gén részleges duplikációja, melyet Cs. Cs. húgában mutattunk ki, felelős lehet-e a klinikailag észlelt enyhe, de a kezelésre nem reagáló proteinuriáért. A gyermekekben látott szokatlan kópiaszám-defektusok egyik magyarázata az lehet, hogy a WT1 gént valamiért nagy gyakorisággal érinti egyenlőtlen *crossing over* az egyik szülő gamétaképzése során (az anya valószínűbb jelöltnek tűnik, mivel az apa ágán nem fordult elő urogenitális betegség).

4.2. WT1-expresszió malignus hematológiai betegségeken

A WT1-expresszió qRT-PCR-es mérését jelenleg főként AML-ben végzik. Bár myeloid és lymphoid daganatos sejtvonalakban egyaránt kimutatható az emelkedett expresszió, ennek genetikai háttere (legalábbis valamilyen mértékben) biztosan különbözik: kimutatták pl., hogy az AWT1 promoter hipermetilációja a myeloid eredetű neoplasia specifikus markere. Saját kutatásunkban a WT1-ről képződő mRNS mennyiségét a ritkábban vizsgált, lymphoid eredetű malignitásokban, non-Hodgkin lymphomákban és ALL-ben mértük meg.

Különösen a lymphomákra igaz, hogy a WT1 gén expressziójával és annak klinikai jelentőségével (némi meglepő módon) mostanáig keveset foglalkozott a szakirodalom. A témában jelenleg elérhető publikációk szerzői immunhisztokémiai módszerekkel jelölték a WT1 fehérjét lymphomás daganatszövetben, ill. nyirokcsomókban.

Saját közleményünkben elsőként számoltunk be WT1-pozitív köpenysejtes lymphomáról: 8 betegünk közül 4-ben mutattuk ki a gén expresszióját. Mind a teljes

($p=0,0082$), mind a betegségmentes túlélés ($p=0,0177$) esetében szignifikáns különbséget tapasztaltunk a WT1-negatív betegek javára. Ez még az alacsony betegszámot figyelembe véve is azt sugallja, hogy a WT1-expresszió prognosztikai szempontból sem érdektelen, ezért hangsúlyozzuk, hogy több, nagyobb esetszámú vizsgálatra lenne szükség a gén szerepének bizonyítására lymphomákban.

Az egyik ilyen beteg azután került be a vizsgálatba, hogy 5 évvel korábban diagnosztizált lymphomája relapszust mutatott. A kezdetben mért negatív érték (0,0026) 1 évvel később szokatlanul magas (2,07) expresszióba csapott át; ezzel a megfigyeléssel egyidőben a lymphomából myelodysplasiás szindróma kezdett kifejlődni. Ebben az esetben a WT1-pozitivitás mértéke inkább az MDS-re, mintsem a non-Hodgkin lymphomára utal. A génexpresszió vizsgálata ezért is fontos lehet a lymphomás betegeknél, főleg a hosszú ideig kezelt esetekben, ahol nagyobb valószínűséggel lehet számítani a myelodysplasiás szindróma kialakulására.

A perifériás T-sejtes lymphomát 9-ből 4 esetben találtuk WT1-pozitívnak, de az expresszió nem mutatott összefüggést a betegség prognózisával. 2 MALT, valamint 2 Burkitt lymphomás esetet is megvizsgáltunk, ezek mindegyike WT1-negatívnak bizonyult.

Vizsgált betegeink kisebb csoportját (7 személyt) nem lymphomával, hanem B-sejtes ALL-lel diagnosztizálták. WT1-pozitivitást 5 esetben találtunk. A teljes túlélésben látott különbségeket nem tudtuk értékelni, mivel a 2 WT1-negatív eset klinikailag gyors lefolyással járt, és korai halálhoz vezetett. Azon betegeknél viszont, akiknél elértük a remissziót, különbség látszik a végig WT1-pozitív, valamint a kezelés hatására negatívvá vált esetek között (de ez, valószínűleg az alacsony betegszám miatt, statisztikailag nem szignifikáns). ALL-ben a saját eredményeink megerősítik az utóbbi időben megjelent nagy esetszámú tanulmányok konklúzióját: bár kérdéses, hogy a WT1 expressziója önmagában szignifikáns hatással van-e a túlélésre, a génexpresszió változásai összefüggésben lehetnek a prognózissal.

Összesítve az eredményeket, noha a közleményünk ALL-ben (a kis esetszám miatt) nem sokat tesz hozzá a korábban leírt adatokhoz, a non-Hodgkin lymphomák vonatkozásában fontos új eredményt prezentál: a WT1-pozitivitás több kórképben is kimutatható, mint korábban gondolták, és bizonyos lymphomatípusokban akár a leukemiákhoz hasonlóan befolyásolhatja a prognózist.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A WT1 gén terméke egy rendhagyó transzkripciós faktor, amely különböző celluláris tényezők függvényében egyaránt képes aktiválni, valamint represszálni bizonyos promotereket, ill. egy izoformája révén poszttranszkripciós szinten is szabályozza targetjeit. A gén klinikailag elsősorban a gonádok és más szervek fejlődésében, valamint a daganatok pathogenesisében játszott kettős szerepe (onkogén és tumorszupresszor) miatt jelentős.

A bemutatott kutatás során egyrészt egy férfi pszeudohermafroditizmussal, FSGS-sel, Wilms-tumorrall, ALL-lel és angioblastoma cerebellivel járó, komplex klinikai kép hátterében kerestük a WT1 gén defektusát. Vérből izolált DNS-ből elvégeztük az egyes exonok PCR-es amplifikálását és szekvenálását, valamint a gén kópiaszám-analízisét qRT-PCR-rel, az FFPE mintákat pedig WT1 elleni antitesttel jelöltük.

Az eredmények szerint a betegnél a WT1 génre lokalizált mikrodéléciónról van szó: ez a WAGR szindróma speciális, a PAX6-ot nem érintő esetére utal. A beteg húgában a gén részleges duplikációját mutattuk ki, amely felveti a meiotikus *crossing over* rendellenességét az egyik szülőben.

Másik tanulmányunkban non-Hodgkin lymphomás és akut lymphoid leukemiás betegekben vizsgáltuk a WT1-expresszió gyakoriságát és prognosztikai szerepét. Ehhez bizonyos időközönként vérmintákat vettünk a betegektől, és qRT-PCR segítségével mértük a WT1 mRNS mennyiségét és annak időbeli változását.

Először számoltunk be WT1-pozitív köpenysejtes lymphomáról, miután a vérben keringő lymphomasejtekből kimutattuk az RNS-t. A betegségben a WT1 gén expressziója szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel, ehhez hasonló tendenciát figyeltünk meg ALL-ben is. Perifériás T-sejtes lymphomában találtunk ugyan WT1-pozitivitást, ám az nem befolyásolta a prognózist. A vizsgált MALT és Burkitt lymphomás esetek WT1-negatívnak mutatkoztak.

Eredményeink azt sugallják, hogy a WT1 nem csak leukemiákban, de esetleg a non-Hodgkin lymphomák bizonyos típusaiban is használható lehet prognosztikai markerként.

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. A tézis alapjául szolgáló közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/297/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Buglyó Gergely

Neptun kód: E02J75

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1*. Ujj, Z., **Buglyó, G.**, Udvardy, M., Vargha, G., Biró, S., Rejtő, L.: WT1 Overexpression Affecting Clinical Outcome in Non-Hodgkin Lymphomas and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathol. Oncol. Res.* 20 (3), 565-570, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-013-9729-7>
IF:1.806 (2013)
2. **Buglyó, G.**, Méhes, G., Vargha, G., Biró, S., Mátyus, J.: WT1 microdeletion and slowly progressing focal glomerulosclerosis in a patient with male pseudohermaphroditism, childhood leukemia, Wilms tumor and cerebellar angioblastoma. *Clin. Nephrol.* 79 (5), 414-418, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5414/CN107276>
IF:1.232

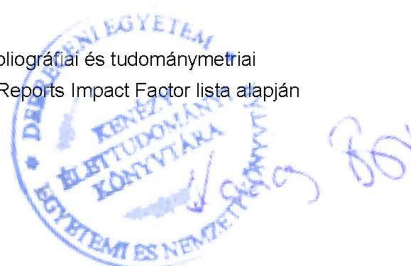
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,038

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,038

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

Debrecen, 2014.09.19.

*Ujj Zsófia és Buglyó Gergely megosztott első szerzők.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. ☐ Tel.: (52) 518-600
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: lib.unideb.hu

6.2. A tézishoz kapcsolódó előadások, poszterek

Buglyó G, Rejtő L, Mátyus J, Biró S, Ujj Z (2011) Clinical association of mutations and expression abnormalities of the gene WT1. 4th Molecular, Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető (előadás)

Buglyó G, Biró S, Méhes G, Mátyus J (2011) WT1 mikrodeléció atípusos klinikai kép hátterében: pseudohermaphroditismus, Wilms tumor, leukemia, cerebellaris angioblastoma és FSGS. Magyar Nephrológiai Társaság XXVIII. Nagygyűlése, Eger (előadás)

Buglyó G, Rejtő L, Biró S, Ujj Z (2012) The role of WT1 as a prognostic marker in non-Hodgkin lymphomas and adult acute lymphoblastic leukemia. European Medical Students' Conference, Debrecen (előadás)

Buglyó G, Rejtő L, Biró S, Ujj Z (2013). WT1 as a marker of prognosis in non-Hodgkin lymphomas and adult acute lymphoblastic leukemia. 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető (előadás)

Buglyó G, Rejtő L, Biró S, Ujj Z (2013) A WT1 gén expressziójának qRT-PCR-es meghatározása hematológiai kórképekben. Genetikai Műhelyek Magyarországon: XII. Minikonferencia, Szeged (előadás)

Buglyó G, Rejtő L, Biró S, Ujj Z (2014) A WT1 gén expressziója, mint prognosztikai faktor akut leukemiákban és non-Hodgkin lymphomákban. A DE Humángenetikai Tanszékének tudományos ülése, Debrecen (előadás)

6.3. Egyéb előadások, poszterek

Beyer D, **Buglyó G**, Markovics A (2014) Malignus hematológiai kórképekre hajlamosító genetikai tényezők kvantitatív-PCR vizsgálata. A DE Humángenetikai Tanszékének tudományos ülése, Debrecen (poszter)