

Új sejtszintű D-vitamin hatások egészséges és kóros szövetekben

Tézisfüzet

Dr. Horváth Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter András, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bittner Nóra, PhD., főorvos

Dr. Reusz György, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Gerő László, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szalai Csaba, DSc., egyetemi tanár

Dr. Kiss Csaba, PhD., főorvos

Budapest
2017

Bevezetés

A D-vitamin szerkezete, hatásmechanizmusa, D-vitamin ellátottság

A kolekalciferol egy gyűrűs szerkezetű, lipofil molekula. Mivel a vegyület szintézise az emberi szervezetben is megtörténhet, a vitamin elnevezés nem állja meg a helyét. A vegyületet sokan a hormonok közé sorolják. Előállítás a bőrben 7-dehidrokoleszterinből (7-DHC) történik. UVB fény hatására a 7-DHC pre-D3-vitaminná alakul. Ez a reakció a bőr epidermális rétegében, azon belül is a stratum basaleban és a stratum spinosumban történik a legnagyobb mértékben. Ezt követően a pre-D3-vitamin a májban található CYP27A1 enzim hatására 25-hidroxi-kolekalciferollá alakul. A vérben keringő 25-hidroxi-kolekalciferolból a CYP27B1 enzim készíti el a biológiailag aktív 1,25-dihidroxi-kolekalciferolt. Az 1,25-dihidroxi kolekalciferol a VDR-hez (D-vitamin receptor) kötődve fejt ki hatását. A vegyület inaktiválását 1,24,25-trihidroxikolekalciferollá a CYP24A1 enzim végzi. Az inaktív forma kalcitriol savvá alakul, ami egy hidrophil vegyület, és a szervezetből a vesén keresztül kiválasztható.

A VDR egy Zn-ujjas doménnel rendelkező magi receptor fehérje. A ligandját megkötvén hatását a sejtmagban a génexpresszió befolyásolásával váltja ki.

A magi receptorokon kifejtett lassú, génexpresszió változást okozó hatásokon kívül a D-vitaminnak ismertek gyorsan kialakuló hatásai is. A vékonybélben az emelkedett D₃-vitamin szint Ca²⁺ és foszfát gyors felszívódását okozza. Ennek a háttérében a sejtfelszíni 1,25-D₃-MARRS (Membrane Associated Rapid Response Steroid Receptor) receptor áll. Ez a fehérje hatását cAMP emelkedés révén váltja ki.

A D-vitamin és a WNT útvonal kapcsolata a csontanyagcserében

A D-vitamin és a WNT útvonal közötti legfontosabb kapocs a Dickkopf-fehérje (DKK). A DKK2 fehérje expressziója D-vitamin jelenléte mellett jelentős emelkedést mutat mind normoxia, mind hypoxia esetén, azonban a differenciálódó osteoblastokban a DKK2 expresszió csökkenése következik be emelt D-vitamin koncentráció mellett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a két útvonal között bonyolult, illetve még nem teljesen tisztázott kölcsönhatások vannak, feltételezhető, hogy a WNT útvonal szerepe a korai

osteoblast differenciációban játszik szerepet, míg a D-vitamin a késői differencializálódásban, valamint a megfelelő szerves mátrix kialakításában fontos.

D-vitamin és tumorigenezis

A D-vitamin daganatellenes szerepét számos vizsgálatban sikerült bizonyítani. A vitamin szintje fordított arányosságban áll számos daganattípus előfordulási gyakoriságával. A daganatos megbetegedések száma az egyenlítőtől a sarkkörök felé növekszik, tehát a napfényes órák csökkenésével emelkedik. Ez a megfigyelés is mutatja, hogy valamilyen összefüggés van a fény expozíció és a daganatok között, ezt pedig a D-vitamin mediálja. Az aktív D₃-vitamin helyi szintjét a szöveti szinten megtalálható szintetizáló-lebontó enzimek aránya is meghatározza. Igaz, hogy a D-vitamin szintézis legfőbb helyszíne a vese, de a szervezet több szövete is képes a D-vitamin metabolizmus enzimeit helyi szinten előállítani. (Bikle 2011) Nincs ez másképp a vastagbélhám esetén sem. A vastagbélben kimutatható mind a 25-hidroxitamin D₃ 1- α -hidroxiláz (CYP27B1), mind az 1 α ,25-dihidroxitamin D₃-24-hidroxiláz (CYP24A1) is. A CYP27B1 a D vitamin szintjét emeli, a CYP24A1 azt csökkenti, ezzel a VDR számára meghatározzák a szubsztrát kínálatot, amivel közvetetten befolyásolják a receptor aktivitást. A korai CRC elváltozásban kimutatható a CYP27B1 szint emelkedése. Ez a tumor részéről egy korai, endogén antiproliferatív mechanizmusnak tekinthető. (Bareis, Kallay et al. 2002) Azonban különböző sejtvonalakon végzett vizsgálatokat áttekintve megfigyelhető, hogy ez a hatás a későbbiekben elveszik.

Célkitűzés

Vizsgálataink során elsősorban a daganatos megbetegedésekre – tekintettel azok emelkedő incidenciájára és magas halálozására - valamint a csontanyagcsere betegségekre – hisz a posztmenopauzás nők döntő többségét érintik - koncentráltunk.

A következő kérdésekre kerestünk választ:

- Valóban képes-e a D-vitamin tumor sejtek növekedésének gátlására?

- Képesek-e a tumoros sejtek kivédeni a D-vitamin által közvetített antiproliferációs hatást?
- Tudjuk-e a daganatos sejtek védekezését szelektíven gátolni úgy, hogy az ép szövetek ne szenvedjenek kárt?
- Megfigyelhetők-e a fenti mechanizmusok in vivo körülmények között, humán eredetű szövettani mintákban?
- Milyen a CYP24A1 enzim ill. a CYP27B1 enzim expressziója papilláris pajzsmirigy tumor szövetben?
- Összefügg-e a CYP24A1 expresszió demográfiai, hisztológiai és klinikai paraméterekkel?
- Milyen a magas CYP24A1 expressziót mutató daganatok eloszlása a PTC minták funkcionális alcsoportjai között?
- Megfigyelhető-e összefüggés a D-vitamin és a WNT útvonal között a csontanyagcserében?
- A csontanyagcserében már leírt WNT útvonalakat érintő polimorfizmusok és a keringő D-vitamin szint között találunk-e összefüggést?

Módszerek

A 24-hidroxiláz (CYP24A1) és 1-alfa hidroxiláz (CYP27B1) gén, valamint fehérje szintű expressziós vizsgálata differenciált pajzsmirigy tumorokban

Vizsgált populáció

A génextpressziós vizsgálatokat 100 magyar, kaukázusi, nem rokon betegen végeztük. Minden betegről gyűjtöttünk papilláris tumor mintát, valamint szövetmintát az ép pajzsmirigy területről. A mintákban meghatároztuk a szomatikus mutáció státuszt, vizsgáltuk a BRAF 600-as kodont, a HRAS 61-es kodont, a KRAS 12, 13-as kodont, az NRAS 61-es kodont, az ELE1/RET, a CCDC6/RET átrendeződéseket. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága elfogadta (SOTE-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU), minden beteg írásos beleegyezést adott.

RNS izolálás és kvantitatív valós idejű PCR

A vizsgálatokat 31 friss műtéti és 69 formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintából végeztük el. Minden mintapárból teljes RNS-t izoláltunk (a tumorszövetből és a környező ép szövetből is) Roche High Pure Total RNS izoláló kittel (Roche, Indianapolis, IN, USA) a gyártó protokollja szerint. Az FFPE mintákból a Roche High Pure RNA Paraffin kittel (Roche, Indianapolis, IN, USA) vontuk ki az RNS-t. Az izolált RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, USA) 260/280 nm-en. 200U SuperScriptIII RNáz H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével 500 ng RNS-t fordítottunk cDNS-sé, primerként 125 ng random hexamer primert (Promega, Madison, WI, USA) használtunk 40 U RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor jelenlétében 30 ul térfogatban.

A kiválasztott gének expressziós különbségét validált, gyári Taqman próba alapú kvantitatív valós idejű RT-PCR segítségével határoztuk meg (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Minden szett tartalmaz egy forward, valamint egy reverz primert és egy fluoreszcens próbát (ID CYP24A1: Hs00167999_m1, ID CYP27B1: Hs00168017_m1). A próbák exonok találkozását fedik le, így nem detektálják az esetleges genomi DNS szennyeződést. A PCR reakció térfogata 20 ul volt, amelybe 2 ul cDNS-t, 10 ul Taqman 2x Universal PCR No AmpErase UNG MasterMix-et (Applied Biosystems), 1 ul 20x Taqman Gene Expression Assay-t (Applied Biosystems) és 7 ul ultrapurified MilliQ vizet mértünk. A minták sokszorosítására és a fluoreszcencia detektálására ABI Prism 7500 RealTime PCR rendszert használtunk. Relatív kvantifikálási vizsgálatunkat a 7500 System SDS szoftver 1.3-as verziójával végeztük. Az mRNS-ek relatív mennyiségét az átlagolt dCt értékekből számoltuk, cut-off értéként a két nagyságrendbeli mRNS expresszió változást választottuk a tumoros és a saját kontroll szövet között.

Genomi DNS izolálás, szomatikus pontmutációk és génátrendeződések analízise

A genomi DNS-t a Roche High Pure PCR template preparation kit segítségével izoláltuk. Az izolált DNS mennyiségét Qubit dsDNA HS Assay Kit-tel mértük.

A genetikai eltérések azonosításához a Nikiforov és mtsai által leírt protokoll egy módosított verzióját használtuk. A genomi DNS-ben BRAF (rs113488022), NRAS (rs79057879), HRAS (rs28933406), KRAS (rs121913535) pontmutációkat

azonosítottunk valós idejű PCR segítségével (Roche LightCycler 2.0 Instrument, Roche Instrument Center AG, Rotkreuz, Svájc).

Az ELE1/RET és a CDC6/RET génátrendeződéseket valós idejű RT-PCR technikával azonosítottuk. A szükséges próbákat úgy terveztük, hogy az mRNS-ek fúziós pontjait ismerjék fel.

A CYP24A1 fehérje immunhisztokémiai detektálása

A fehérje immunhisztokémiai azonosítása formalin fixált, paraffinba ágyazott metszeteken történt, nyúl eredetű, tisztított, antihumán CYP24A1 ellenes antitestekkel (Prestige Antibodies, Sigma-Aldrich). A detektálást Novolink polimer kittel hajtottuk végre, a magfestéshez Mayer-féle hematoxilint használtunk. Az immunhisztokémiai festést egy 4 csatornás Freedom Evo automata pipetta rendszerrel végeztük. (TECAN, Mannerdorf, Svájc)

Statisztikai analízis

A CYP24A1 és a CYP27B1 expressziót 100 humán papilláris pajzsmirigy carcinomában (PTC) hasonlítottuk össze a betegekből származó saját kontroll szövettel. Az expressziós értékek nem követték a normál eloszlást, így a nem paraméteres Mann-Whitney U tesztet használtuk. Azokat az eredményeket tekintettük szignifikánsnak, ahol a p-érték kevesebb volt, mint 0,05.

Azokban az esetekben, ahol folyamatos változókat hasonlítottunk össze, a Pearson-korreláció számítást választottuk. Esetünkben ez a CYP24A1 expresszió és a betegek életkora volt.

A PTC mintákat 4 különböző csoportba soroltuk a további analízisekhez. A besorolást a következő kritériumok szerint végeztük:

1. Szomatikus onkogén mutációk (NRAS, KRAS, HRAS, BRAF) és/vagy génátrendeződések (ELE1/RET, CCDC6/RET) jelenléte, illetve hiánya.
2. Konvencionális PTC vagy más hisztológiai típusú PTC (follikuláris, Hürthle-sejtes, magas sejtes, enkapszulált variáns és mikrocarcinómák).
3. A tumor mellett egyéb pajzsmirigy betegség jelenléte (Hashimoto-thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis), illetve hiánya.

4. Nyirokcsomó metasztázis és/vagy vaszkuláris invázió jelenléte, illetve hiánya.

A tumorok CYP24A1 expresszióját a különböző csoportokban Khí-négyzet teszttel hasonlítottuk össze.

Főkomponens analízist használtunk arra, hogy ezeket az információkat is elemezni tudjuk. Minden komponenst úgy határoztuk meg, hogy a varianciája a teljes varianciából a lehető legnagyobb legyen. Az egyes vektorokból megfigyelési koordinátákat számoltuk, hogy megjeleníthetők legyenek a komponens térben. Az adatok elemzéséhez a SYNTAX 2000 program csomagot használtuk.

D-vitamin kezelés és a 24-hidroxiláz (CYP24A1) gátlásának vizsgálata in vitro humán colon tumor sejtvonalon

Használt vegyületek

A CYP24 enzim a CYP450 szupercsalád tagja. Ezen enzimek közös tulajdonsága az aktív helyen található hem domén, melynek katalitikus funkciója szempontjából fontos a porfirin vázban elhelyezkedő Fe atom.

Az enzim blokkolóknak két típusát különböztethetjük meg. Az egyik csoport az úgynevezett azol típusú inhibitor család. Ezek a vegyületek a CYP450 enzimek hem vasához kötődnek heterociklusos nitrogéntartalmú gyűrűjük segítségével. Az úgynevezett nem azol típusú inhibitorok hatásukat az enzim aktív helyén H-kötések és hidrofób kölcsönhatások kialakításával érik el. Mivel ez egy képlékenyebb mechanizmus, ezért ezekkel a vegyületekkel jelentős szelektivitást érhetünk el, azonban a gátló hatás kisebb, mint az azol típusú inhibitoroknál.

Az általunk vizsgált vegyületek a nem azol típusú inhibitorok közé tartoznak, mivel a szelektivitás kulcskérdése a sikerességnek. A vegyületek nagyobb része tetralonváz szerkezettel bír, míg kisebb részük a szteránváz vegyületek közé tartozik.

A tetralon vegyületek előállításánál használt metódika a 6-metoxi-1-tetralon vegyületek szubsztituált benzaldehidekkel történő kondenzációját foglalta magában.

A kísérletek során általunk használt vegyületek szintézisét korábbi CYP-450 enzim inhibitorok alapján a Szegedi Tudományegyetem Szerves Vegytani Intézete végezte. Ezek a vegyületek szterán-, illetve tetralonváz vegyületek különböző halogénezett

származékai. A vegyületeket 10^{-3} mol/l-es koncentrációban, dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldva tároltuk 4 °C-on. Közvetlenül a kísérletek előtt az oldatok további hígításra kerültek steril tápoldatban (GIBCO'S OPTI-MEM) a kísérletben megkívánt töménységre.

Sejtvonal

Kísérletek során CACO-2 humán sejtvonalat használtunk, mely az ATCC-től (American Type Culture Collection, Manassas Virginia, USA) került megrendelésre. A sejteket 90 %-os konfluencia elérése után passzáltuk. A sejteket 96-os plate-eken tenyésztettük, 24 órával a kísérletek összeállítása előtt a D-MEM táptalajt GIBCO'S OPTI-MEM táptalajra cseréltük.

Sejtproliferációs esszék

A kezdeti vizsgálatok célja az volt, hogy a rendelkezésre álló vegyületek halmazából kiválasszuk azokat, amelyek a sejtszám csökkenését érik el D vitamin jelenlétében, de nem csökkentik azt D vitamin hiányában. Ehhez ideális eljárásnak bizonyult a proteinfestésen alapuló Sulforhodamine- B (SRB) vizsgálat, amely egyszerre olcsó és megbízható. A teszt elve az, hogy az SRB festékekkel megfestjük a wellék fehérje tartalmát, majd ezt visszaoldva optikodenzitometriás módszerrel szemikvantitatívan következtethetünk a wellben lévő fehérje mennyiségre, mely arányos az életképes sejtek számával. A megkötött festékmolekulákat Trisma-Sol-ban oldottuk vissza, majd a plate-et 520 nm-es hullámhosszon mértük ELISA leolvasó segítségével. (ThermoFisher Luminoskan Ascent, Waltham, MA, USA)

Így szemikvantitatívan megállapítható volt, hogy a használt vegyület koncentráció függően csökkenti-e a sejtszámot D vitamin (100 nmol/l) jelenlétében.

A vegyületek citotoxicitásának mérését a sejtfelülészóban mérhető LDH (laktát-dehidrogenáz) aktivitás meghatározásával vittük véghez. A méréshez szükséges anyagokat a Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) (Roche, Indianapolis, IN, USA) tartalmazta. A gyártó előírása szerint, spektrofotométerrel történt a mérés. (ThermoFisher Luminoskan Ascent, Waltham, MA, USA)

Annak eldöntésére, hogy a sejtszámcsökkenés milyen természetű (citotoxikus vagy citosztatikus), mértük a sejtosztódás aktivitását a kezelést követően. Ehhez a Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche, Indianapolis, IN, USA) kítet használtuk. A gyártó előírása szerint, spektrofotométerrel történt a mérés. (ThermoFisher Luminoskan Ascent, Waltham, MA, USA)

RNS izolálás és kvantifikálás

Ehhez a High Pure RNA Isolation Kit-et (Roche, Indianapolis, IN, USA) használtunk. Minden mintát duplikátumokban vizsgáltunk ABI Prism 7500 real-time PCR rendszeren (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A relatív mennyiségeket a 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg.

Statisztika

A különböző csoportok összehasonlítását ANOVA módszerrel végeztük, a post hoc tesztelés Tukey HSD teszt segítségével történt. Az SPSS 18 for Windows szoftver segítségével.

A WNT jelátviteli rendszer kapcsolata a D-vitamin és csontanyagcserével

Vizsgált populáció

A vizsgálatba 932 nem rokoni kapcsolatban álló, posztmenopauzás nőbeteget vontunk be. A posztmenopauzás csoportba történő besorolás kritériumai a következők voltak: 40 évnél magasabb életkor, és több, mint egy éve elmaradt menstruáció. Mértük a betegek magasságát, testsúlyát és rögzítettük a betegek életkorát. Teljes csípő és lumbális gerinc (L2-L4) BMD értékeket mértünk Lunar Prodigy DXA scanner (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) segítségével, majd kiszámítottuk a betegek T-score értékeit. A betegek 3 különböző diagnosztikai csoportba kerültek a T-score értékek alapján, ehhez a WHO ajánlásait vettük figyelembe. Nem vertebrális osteoporoticus törésnek azokat az alacsony traumás töréseket vettük, amelyek a 40-ik életév után következtek be, és nem érintették az arcot, koponyát, kéz és lábujjakat, valamint a

gerincet. Ebben a vizsgálatban a kompressziós csigolyatöréseket nem vizsgáltuk. A betegek egy alcsoportjában mértük a szérumban D-vitamin értékeket (146 alany). Minden betegről írásos beleegyezést kaptunk.

Egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP) választás

Nyilvánosan elérhető adatbázisok segítségével választottuk ki a vizsgálni kívánt SNP-eket (<http://genome.ucsc.edu/>, <http://www.genome.gov/gwastudies/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) az LRP5, GPR177 és SP7 génekből.

9 SNP-t választottunk funkciójuk alapján, valamint figyelembe vettük, hogy az adott SNP feltűnt-e már korábban GWAS vizsgálatokban. Az első kritérium alapján misszenz SNP-eket választottunk, a második kritérium alapján pedig olyan SNP-eket, melyek p-értéke kisebb volt, mint 5×10^{-8} . (A kiválasztott SNP-eket, azok lokalizációját, illetve a p-értékeket ld. az Eredmények fejezetben)

Genotipizálás

A betegektől genomiális DNS-t gyűjtöttünk a buccalis nyálkahártya felszínének kaparékából. A DNS-t Roche HighPure PCR Template Purification kit-tel nyertük ki. A DNS minőségét, illetve mennyiségét NanoDrop B-100 spektrofotométerrel határoztuk meg. (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) Minden mintát 10 ng/ul koncentrációra hígítottunk, a genotipizálást pedig egy Sequenom MassARRAY 4-es készüléken végeztük el.

Statisztikai vizsgálat

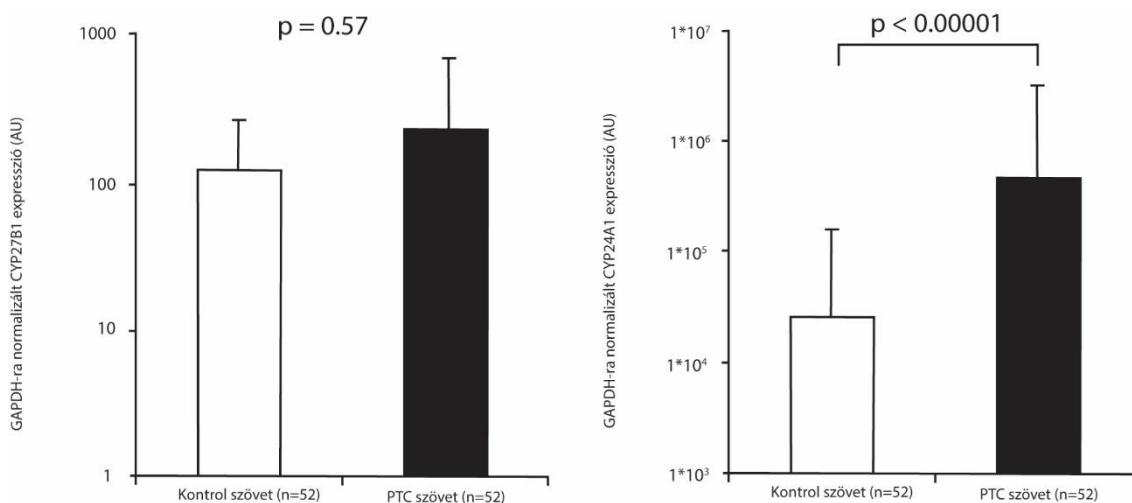
A csoportokat ANCOVA segítségével hasonlítottuk össze, post-hoc tesztként Bonferroni korrekciót használtunk. A BMD értékeket korra és BMI-re normalizáltuk. A tesztek SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A polimorfizmusok kapcsoltságát Haploview 4.0 programmal vizsgáltuk. A különböző gének kapcsolatát az R programnyelv SNPassoc függvény csomagjával vizsgáltuk. Az alfa-értéket 0,05-nek választottuk.

Eredmények

A CYP24A1 és CYP27B1 gének expresszió változása papilláris tumorszövetben a saját ép kontrollhoz képest

A CYP24A1 expresszió jelentősen emelkedett 52 papilláris karcinóma esetében a saját tumor mentes szövethez képest, ebből volt olyan, amelyiknél ezerszeres expresszió növekedést mértünk. Ezekben a mintákban a CYP24A1 GAPDH-hoz viszonyított relatív emelkedése statisztikailag szignifikáns, a p-érték 0,00001-nél kisebb volt. A CYP27B1 expressziója nem mutatott különbséget a tumoros és a normál szövetekben.

(1.ábra)

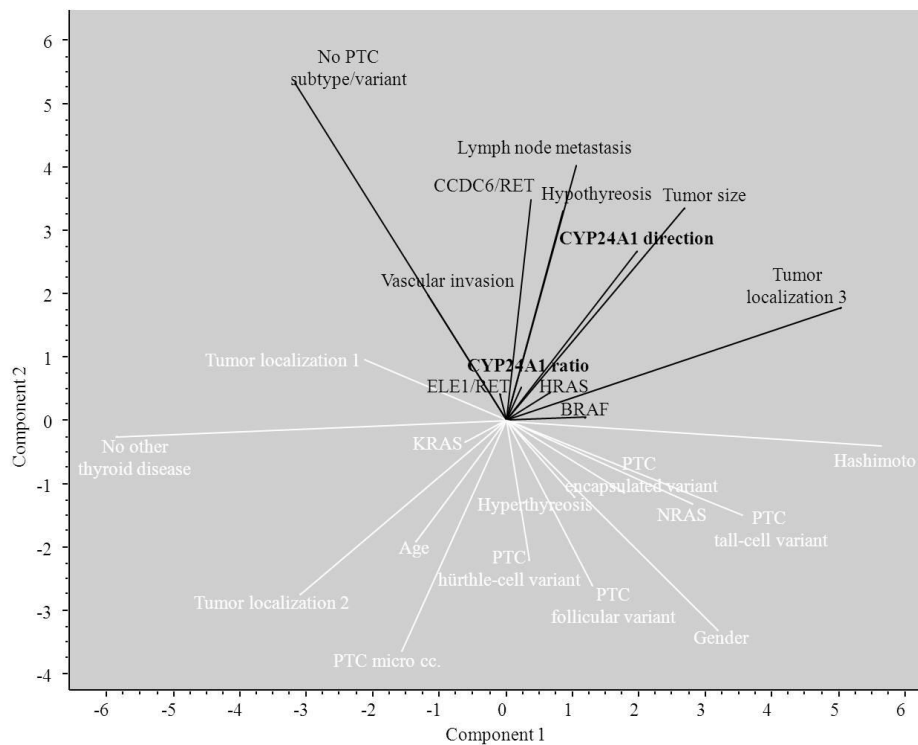


1. ábra: A CYP27B1 és CYP24A1 mRNS expresszió változása kontrol szövetekben és tumorokban. A CYP24A1 expresszió szignifikánsan nő, míg a CYP27B1 expresszióban nincs különbség.

CYP24A1 fehérjeszintű expressziója immunhisztokémiai módszerrel

Azokban a mintákban, amelyekben CYP24A1 mRNS kimutatható volt, immunhisztokémiai festést végeztünk. A tumoros szövetben erős festődés volt kimutatható a környező nem tumoros szövetekhez képest, azokban a daganatokban, ahol a CYP24A1 mRNS szintje is emelkedett volt.

A PCA diagram megmutatja a kapcsolatot a 26 vizsgált demográfiai, klinikai, szövettani és genetikai változó között a 86 PTC mintában. (2. ábra)

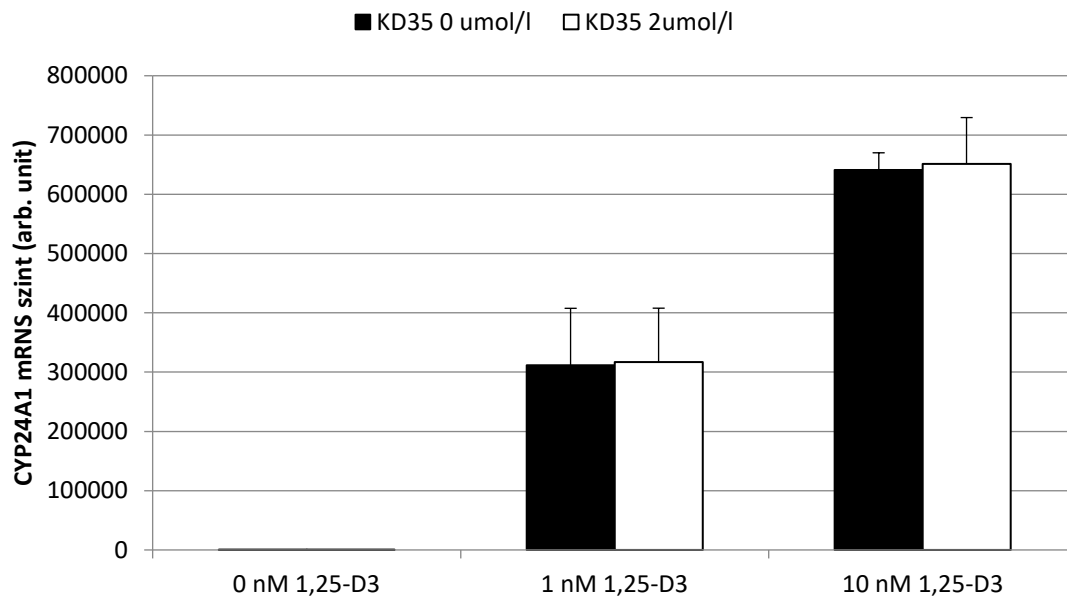


2. ábra: A főkomponens analízis ordinációs diagramja. Az ábrán feketével jelölt változók asszociációt mutatnak a CYP24A1 expresszióval. Pozitív korrelációt találtunk a CYP24A1 expresszió, valamint a malignitást tükröző klinikai paraméterek (nyirokcsomó metasztázis, tumor méret, érbetörés), az ELE1/RET, HRAS, BRAF onkogén mutációk, valamint a klasszikus PTC hisztológia között.

CYP241 inhibitorok hatása a CRC sejtek növekedésére

A CYP24A1 expresszió idő- és koncentrációfüggő változásai 1,25-D3 vitamin kezelést követően CACO-2 sejteken

A CYP24A1 mRNS expresszió emelkedésében már nagyon rövid inkubációs idő után is 6 nagyságrendbeli változás figyelhető meg. Az mRNS szint emelkedését már az inkubáció 30-ik percében ki tudtuk mutatni, míg a maximumát 12-16 órával a 1,25-D3-vitamin adást követően érte el (ld. 9. ábra). 4 órával az inkubáció kezdete után 1 ill. 10 nmol/l-es 1,25-D3-vitamin koncentráció mellett a CYP24A1 mRNS szintje 311,405-szörösre, illetve 612,801-szeresre emelkedett a kezeltlen sejtekéhez képest. (3.ábra)



Tetralon származékok és a CYP24A1 inhibitor, KD-35 vegyület hatása a CACO-2 sejtvonalra

Előzetes vizsgálatok során kimutattuk, hogy bizonyos szintetizált tetralon származékok in vitro képesek voltak csökkenteni a CACO-2 sejtek számát D-vitamin jelenlétében. Ezeket a vegyületeket változó koncentrációban (1 nmol/l-től 10 umol/l-ig), többféle inkubációs idővel (1 naptól 4 napig) vizsgáltuk. Végül a KD-35 jelű vegyületet választottuk ki további vizsgálatok céljából.

Sejtéletképesség (SRB) mérés eredménye

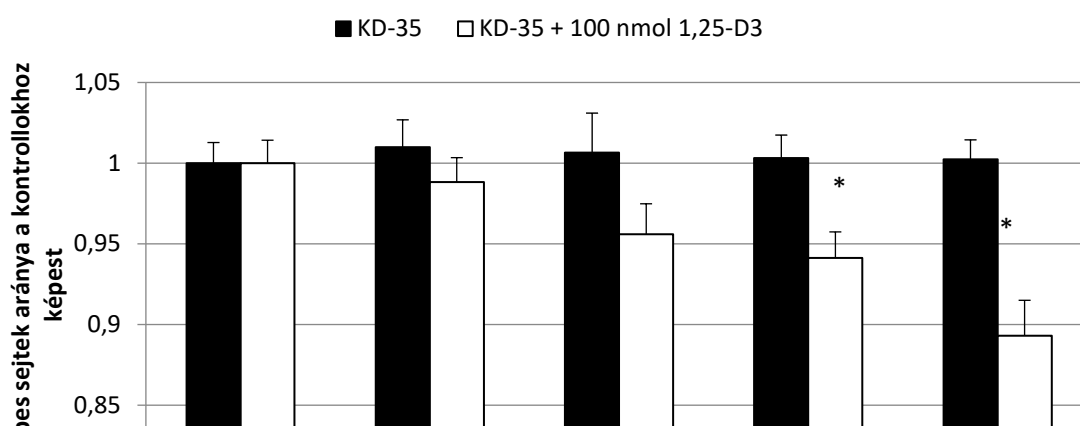
A CACO-2 sejtvonalat 4 napig inkubáltuk 100 nmol/l 1,25-D3-vitamin és 0.1, 0.3, 1,0 ill. 3,0 umol/l KD-35 jelenlétében. A kezelés hatására a sejtek SRB festődésében (vagyis a sejtek életképességében) koncentrációfüggő (2.17, 5.07, 6.18 ill. 10.93%-os) csökkenést

3. ábra: A CYP24A1 mRNS szintje CaCO2 sejtekben változó koncentrációjú D-vitamin hozzáadását követően. A D-vitamin koncentráció függően emeli a CYP24A1 mRNS szintjét, ezt a KD-35 jelenléte nem befolyásolja.

figyeltünk meg azokhoz a kontrollsejtekhez képest, amelyeket csak 100 nmol/l-es D-vitamin koncentráció mellett, CYP24A1 gátló KD-35 nélkül tenyésztünk. (4. ábra)

A citotoxicitás tesztek eredménye

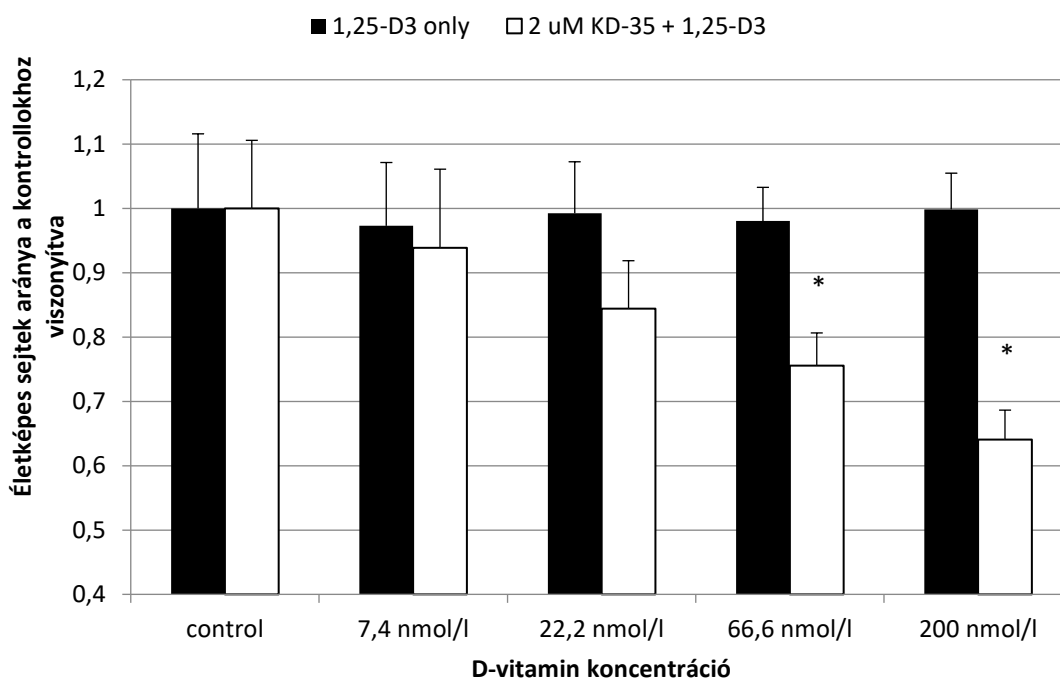
Hogy meghatározzuk a KD-35 vegyület által okozott sejtszám csökkenés természetét, a sejteket citotoxicitás mérésnek vetettük alá. Az általunk használt módszer a sejt felülűszo laktát-dehidrogenáz (LDH) koncentráció mérésén alapul. Egyik kísérleti felállásban sem tudunk kimutatni jelentős változást a sejt felülűszo LDH koncentrációjában. Ez arra enged következtetni, hogy a vegyület által közvetített sejtszámcsökkenés oka nem citotoxikus reakció. (ld. 12. ábra)



4. ábra: Az SRB tesztek eredménye a KD-35 vegyület és D-vitamin jelenlétében. Látható, hogy a vegyület koncentrációfüggően csökkenti a sejtekben szintetizálódó fehérjék mennyiségét.

A sejtproliferációs esszé eredménye

A CACO-2 sejtvonalon 2 $\mu\text{mol/l}$ KD-35 mellett változó 1,25-D3-vitamin koncentrációkat használtunk, a következők szerint: 7,4; 22,2; 66,6 ill. 200 nmol/l. A kontroll sejteket csak KD-35-tel kezeltük. 4 napos inkubációs időt használtunk. Ezt követően a sejteket 2 órán át 5-BrDU-val jelöltük. A kontrollhoz viszonyított relatív sejtproliferáció csökkenés 3,43, 14,81, 22,49, ill. 35,81% volt, arányosan az alkalmazott növekvő 1,25-D3-vitamin koncentrációkkal. (5. ábra)



5. ábra: Életképes sejtek aránya az 5-BrDU inkorporációt követően. Látható, hogy a KD-35 vegyület koncentráció függően csökkenti az életképes sejtek arányát. 66,6 nmol/l koncentráció felett a csökkenés statisztikailag szignifikáns. ($p < 0,05$)

Az expresszált CYP24A1 specifikus mRNS szintje nem változott szignifikánsan azokban a sejtekben, amelyeket KD-35-tel is kezeltünk, azokhoz képest, amelyeket csak 1,25-D3-vitaminnal inkubáltunk. A KD-35 önmagában nem növelte a CYP24A1 expressziót. Míg D-vitamin jelenlétében a CYP24A1 expresszió meredeken emelkedett. A CYP24A1 mRNS szintje nem függött sem a KD-35 koncentrációtól, sem az inkubációs időtől. (14. ábra)

A WNT útvonal szerepe posztmenopauzás nők csontanyagcseréjére

Vizsgálatunk azt találtuk, hogy az LRP5 gén rs4988300 és az rs64008 számú SNP-i összefüggést mutatnak a csonttömeggel. Bonferroni korrekciót követően az rs4988300 hatása mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak ($p=0,004$). Azok a nők, akik a vizsgált SNP heterozigóta genotípusát hordozták, szignifikánsan magasabb csípő BMD értékkel

rendelkeztek. Nem sikerült kimutatni összefüggést az osteoporoticus törések és a vizsgált LRP5 genotípusok között.

Következtetések

Vizsgálatainak alapján látható, hogy a D-vitamin útvonalban szereplő CYP24A1 enzim nagyon fontos szerepet játszik a daganatok patogenezisében. Az irodalomban számos cikket találhatunk, melyben sorra bizonyítják, hogy az alacsony D-vitamin szint szerepet játszik tüdő-, prosztata-, pajzsmirigy-, gyomor-, illetve vastagbél daganatok kialakulásában. Normális D-vitamin szint esetén a tumorok képesek a daganatellenes hatást a vitamint inaktiváló CYP24A1 enzim fokozott termelése útján semlegesíteni.

Pajzsmirigy daganatokban kimutattuk, hogy a CYP24A1 mRNS szintje összefüggést mutat a daganatok invazivitásával, vaszkularizációjával, áttétképző tulajdonságával. CYP27B1 enzim esetében ezt az összefüggést nem tudtuk kimutatni. Ennek oka lehet, hogy a vesében megfelelő mennyiségű, aktív D-vitamin termelődik, ezért a daganatban az aktív D-vitamin szint nem tér el lényegesen az egészséges szövetekben mért intercelluláris D-vitamin szinttől. Azonban a CYP24A1 enzim segítségével a tumor sejt képes az intracelluláris térben csökkenteni az aktív D-vitamin szintet, ezáltal akadályozva a vitamin receptorához való kötődést.

Ahogy a bevezetésében is láttuk, a D-vitamin jelátviteli útvonala és a WNT útvonal között szoros kapcsolat áll fenn a DKK fehérjén keresztül. Emiatt vizsgáltuk, hogy a D-vitamin szintje összefüggést mutat-e a WNT útvonalban fontos szerepet betöltő LRP5, gpr177 illetve sp7 gének polimorfizmusai. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a fent említett gének SNP-i összefüggenek-e a vizsgálatba bevont posztmenopauzás nők csonttömegével illetve törlési kockázatával. Arra az eredményre jutottunk, hogy ezen fehérjék polimorfizmusai nem mutatnak szignifikáns összefüggést a D-vitamin szinttel. Azonban az LRP5 gén rs4988300 polimorfizmusa összefügg a betegek teljes csípő BMD-jével. Ismert, hogy ez a gén fontos szerepet tölt be a csontszövet remodellingjében. Az általunk vizsgált polimorfizmus heterozigóta hordozói szignifikánsan magasabb csont tömeggel rendelkeznek, mint a homozigóta variáns hordozói. Ennek egyik oka lehet, hogy az rs4988300 polimorfizmus nem felelős a biológiai hatásért, azt egy másik, vele egy haplotípus blokkban elhelyezkedő SNP hordozza. Ez az SNP hatását a splicing során az

intron-exon határon elhelyezkedve a splicingot végző RNáz modulálása útján, splicing variánsok kialakításával hajthatja végre. Ennek további vizsgálata, a pontos hatásmechanizmus megismerése további vizsgálatok tárgyát kell, hogy képezze.

Fentiek alapján nyilvánvaló, hogy az európai populációban igen elterjedt D-vitamin hiány nem csak az osteoporosis, hanem a daganatok előfordulási gyakoriságának növekedésében is szerepet játszhat. Továbbá a nemzetközi szakirodalomban leírták, hogy a D-vitamin szerepet játszik az obezitás, a cirkadián ritmus szabályozásában, a kardiovaszkuláris betegségek patogenezisében, illetve fontos immunmoduláló hatása van granulomatosus megbetegedésekben is. Ezért nagyon fontos, hogy az alapellátásban dolgozó orvosok is tisztában legyenek a D-vitamin pótlás szükségességével, illetve az arra vonatkozó legfrissebb nemzetközi ajánlásokkal.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációval összefüggő saját közlemények listája

Kósa, J. P., **P. Horváth**, J. Wölfling, D. Kovács, B. Balla, P. Mátyus, E. Horváth, G. Speer, I. Takács, Z. Nagy, H. Horváth and P. Lakatos (2013). "CYP24A1 inhibition facilitates the anti-tumor effect of vitamin D3 on colorectal cancer cells." World Journal of Gastroenterology **19**(17): 2621-2628.

Horvath, P., B. Balla, J. P. Kosa, B. Tobias, B. Szili, G. Kirschner, G. Gyori, K. Kato, P. Lakatos and I. Takacs (2016). "Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women." J Bone Miner Metab **34**(1): 79-85.

Balla, B., B. Tobias, J. P. Kosa, J. Podani, **P. Horvath**, Z. Nagy, J. Horanyi, B. Jaray, E. Szekely, L. Krenacs, K. Arvai, M. Dank, Z. Putz, B. Szabo, B. Szili, Z. Valkusz, B. Vasas, G. Gyori, P. Lakatos and I. Takacs (2014). "Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer." J Endocrinol Invest.

A disszertációval nem összefüggő saját közlemények listája

Laszlo Kunos, Zsafia Lazar, Fruzsina Martinovszky, Adam D. Tarnoki, David L. Tarnoki, Daniel Kovacs, Bianka Forgo, **Peter Horvath**, Gyorgy Losonczy, Andras Bikov: *Overnight Changes in Lung Function of Obese Patients with Obstructive Sleep Apnoea*. Beitrage zur Klinik der Tuberkulose 10/2016; DOI:10.1007/s00408-016-9957-1

Péter Horváth, Zsófia Lázár, Rita Puskás, Gabriella Gálffy, György Losonczy, László Kunos, András Bikov: *The role of the complement system in the pathomechanism of obstructive sleep apnea syndrome*. European Respiratory Journal 09/2016; 48(suppl 60). DOI:10.1183/13993003.congress-2016.PA2297

Zsófia Lázár, **Péter Horváth**, Rita Puskás, László Kunos, György Losonczy, Gabriella Gálffy, András Bikov: *Bronchial and alveolar nitric oxide levels in healthy volunteers and patients with severe asthma*. European Respiratory Journal 09/2016; 48(suppl 60). DOI:10.1183/13993003.congress-2016.PA1070

Gyöngyi Kirschner, Bernadett Balla, János Kósa, **Péter Horváth**, Andrea Kövesdi, Gergely Lakatos, István Takács, Zsolt Nagy, Bálint Tóbiás, Kristóf Árvai, Péter Lakatos: *Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozinkináz-gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények bemutatása*. Orvosi Hetilap 09/2016; 157(36). DOI:10.1556/650.2016.30525

Kristóf Árvai, **Péter Horváth**, Bernadett Balla, Bálint Tóbiás, Karina Kató, Gyöngyi Kirschner, Valéria Klujber, Péter Lakatos, János P. Kósa: *Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice*. Scientific Reports 06/2016; 6. DOI:10.1038/srep28417

Dániel Németh, Kristóf Árvai, **Péter Horváth**, János Pál Kósa, Bálint Tóbiás, Bernadett Balla, Anikó Folhoffer, Anna Krolopp, Péter András Lakatos, Ferenc Szalay: *Clinical Use of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Wilson's Disease*. Gastroenterology Research and Practice 01/2016; 2016(4). DOI:10.1155/2016/4548039

Bálint Tóbiás, Csaba Halászlaki, Bernadett Balla, János P Kósa, Kristóf Árvai, **Péter Horváth**, István Takács, Zsolt Nagy, Evelin Horváth, János Horányi, Balázs Járay, Eszter Székely, Tamás Székely, Gabriella Győri, Zsuzsanna Putz, Magdolna Dank, Zsuzsanna Valkusz, Béla Vasas, Béla Iványi, Péter Lakatos: *Genetic Alterations in Hungarian*

Patients with Papillary Thyroid Cancer. Pathology & Oncology Research 08/2015; 22(1). DOI:10.1007/s12253-015-9969-9

Balint Tobias, Bernadett Balla, P Janos Kosa, Istvan Takacs, Zsolt Nagy, **Peter Horvath**, Balazs Jaray, Eszter Szekely, Roland Istok, Tamas Szekely, Peter Lakatos: *Detection of somatic oncogene alterations in FNA samples of cold nodules and 3 years follow-up of patients in Hungary*. 05/2015; DOI:10.1530/endoabs.37.EP853

Bernadett Balla, **Peter Horvath**, Balint Tobias, Gabriella Gyori, Balazs Jaray, Janos Kosa, Peter Lakatos: *Vitamin-D neutralising CYP24A1 gene expression in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples*. 05/2015; DOI:10.1530/endoabs.37.EP855

H.N.A. Jozilan, **P. Horvath**, J.P. Kosa, P. Lakatos, D. Nemeth, J. Wölfling, D. Kovacs, B. Bodnar, P. Matyus, E. Horvath, I. Kovalszky, F. Szalay: *P0321: Increased anti-tumor effect of vitamin D after CYP24A1 inhibition on HCC cell lines*. Journal of Hepatology 04/2015; 62. DOI:10.1016/S0168-8278(15)30536-5

D. Németh, J. Pál Kósa, K. Árvai, **P. Horváth**, B. Tobiás, B. Balla, A. Folhoffer, A. Krolopp, P. András Lakatos, F. Szalay: *P1224: Next-generation sequencing for the diagnosis of wilson's disease*. Journal of Hepatology 04/2015; 62. DOI:10.1016/S0168-8278(15)31420-3

Kristóf Arvai, **Péter Horváth**, Bernadett Balla, Anna M Tőkés, Bálint Tobiás, István Takács, Zsolt Nagy, Péter Lakatos, János P Kósa: *Rapid and cost effective screening of breast and ovarian cancer genes using novel sequence capture method in clinical samples*. Familial Cancer 05/2014; 13(4). DOI:10.1007/s10689-014-9730-7

D Németh, A Folhoffer, A Krolopp, J Kósa, K Árvai, **P Horváth**, P Lakatos, Z Gerlei, L Kóbori, D Görög, M Szathmári, F Szalay: *New mutation of ATP7B gene detected by Ion Torrent in a Wilson patient with acute on chronic liver failure, transplanted via Eurotransplant*. Zeitschrift für Gastroenterologie 05/2014; 52(05). DOI:10.1055/s-0034-1376107

Bernadett Balla, Kristóf Arvai, **Péter Horváth**, Bálint Tobiás, István Takács, Zsolt Nagy, Magdolna Dank, György Fekete, János P Kósa, Péter Lakatos: *Fast and Robust Next-Generation Sequencing Technique Using Ion Torrent Personal Genome Machine for the*

Screening of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Gene. Journal of Molecular Neuroscience 03/2014; 53(2). DOI:10.1007/s12031-014-0286-7

Balint Tobias, Bernadett Balla, Janos P Kosa, Janos Horanyi, Istvan Takacs, Zsolt Nagy, **Peter Horvath**, Balazs Jaray, Eszter Szekely, Roland Istok, Tamas Szekely, Peter Lakatos: *Detecting somatic oncogene mutations in FNA samples of cold nodules in Hungary.* 03/2013; DOI:10.1530/endoabs.32.P1108

Bernadett Balla, Janos Kosa, Balint Tobias, Istvan Takacs, Zsolt Nagy, **Peter Horvath**, Janos Horanyi, Eszter Szekely, Balazs Jaray, Peter Lakatos: *Examination of CYP24A1 and 'three-genes' (SFN, MRC2, HMGA2) expressions in different pathological subgroups of human papillary thyroid cancer.* 03/2013; DOI:10.1530/endoabs.32.P1098

P Horváth, JP Kósa, J Wölfling, B Balla, D Kovács, P Mátyus, E Horváth, G Speer, I Takács, Z Nagy, P Lakatos: *D-hormon és CYP24A1-gátlás: új megközelítés a colorectalis daganatok kezelésében.* Magyar Belorvosi Archivum 01/2011; 64(5).