

A kalciumanyagcsere vizsgálata: Honnan hová vezet?

Dr. Lakatos Péter

Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika



- **Kalcium nélkül nincs élet!**
- **Szűk határok között mozoghat csak a kalcium konc.**
- **Szárazföldi élet → bizonytalan kalcium felvétel**
- **Bonyolult szabályozó mechanizmus alakult ki**
- **Csont: kalcium raktár**
- **A raktár tömegének csökkenő állapota: osteoporosis**

Megoldatlan: az elveszett csont visszatöltése.

A gímszarvas ciklikus fiziológiás osteoporosisa



Orosz László



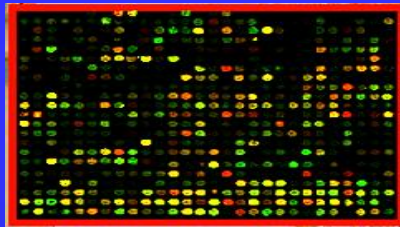
Gímszarvas (*Cervus elaphus*)

Mintavétel: bordacsont



mRNA izolálás

cDNA microarray analízis

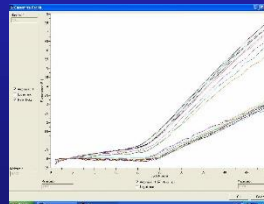


„Data mining”

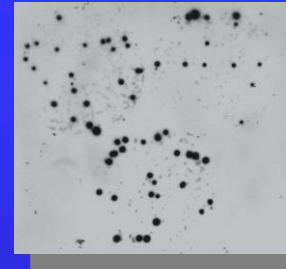
Differentially expressed genes in rib samples

Induce Bone Resorption	Promote Replacement
PLA2: intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 gamma	HIP2: huntingtin interacting protein 2
TTCT7A: tetratricopeptide repeat domain A7	FABP4: fatty acid binding protein 4
PFAAP2: Homo sapiens phosphonofomat immuno-associated protein2	CtnnB1: catenin beta 1
ESTs [H92192, Hs 28310] weakly similar to A43932 mucin2 precursor	COL5A2: collagen, type V, alpha 2
Kelch-like protein 8	OSF1: osteoclast stimulating factor 1= Ptn.pleiotrophin
creatine kinase	THRAP2: thyroid hormon receptor associated protein2
enolase 1, (alpha) (ENO1)	KPNB2: karyopherin (importin) beta 2
low density lipoprotein receptor-related protein 4	HSP105B: heat shock 105kD
KIAA1140 protein	WIF1: Wnt inhibitory factor
AA489194	COL1A1: collagen, type I, alpha 1

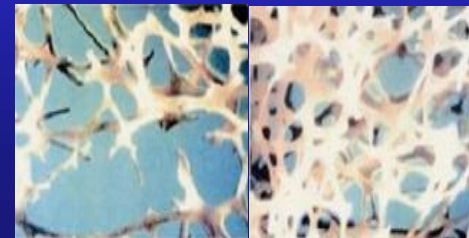
Validálás



cDNS könyvtárak készítése és szűrése



Tesztelés humán mintákon: csontritkult vs. egészséges



Humán diagnosztika és terápia!

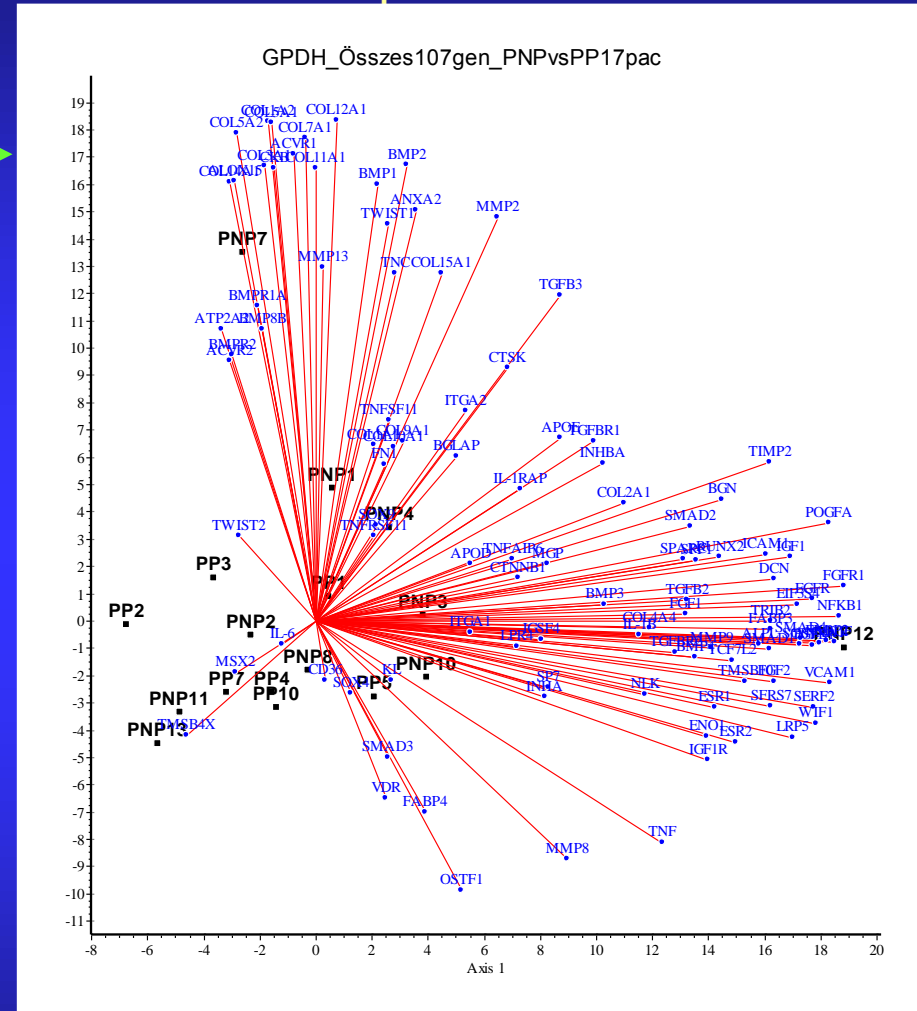
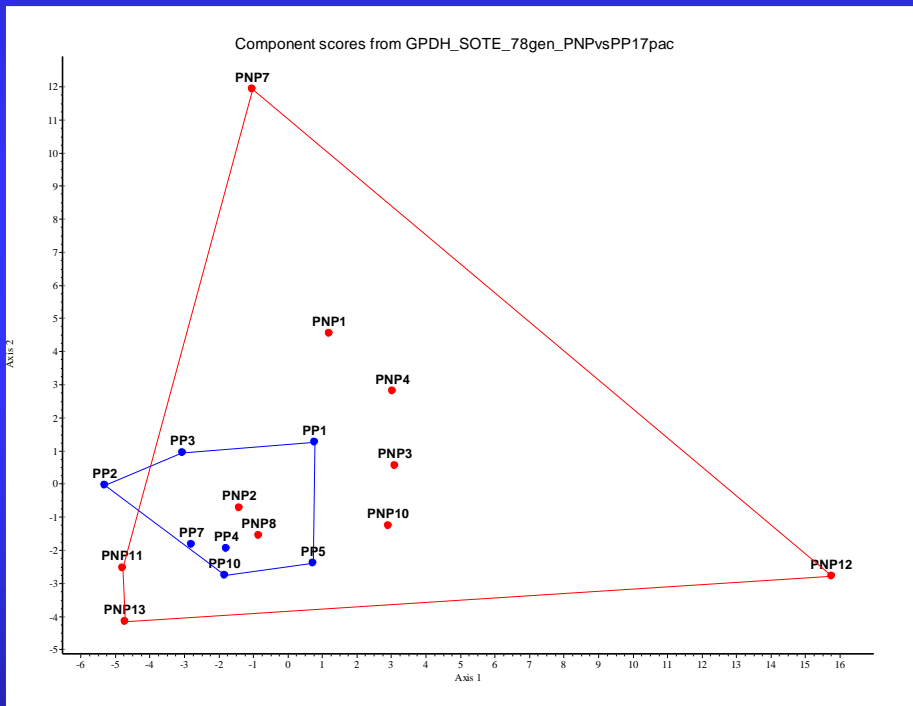
Szignáltranszdukciós útvonalak térképezése



Eltérően expresszálódó gének

Főkomponens analízis x

Eltérően expresszálódó gének
gímszarvas gének esetén

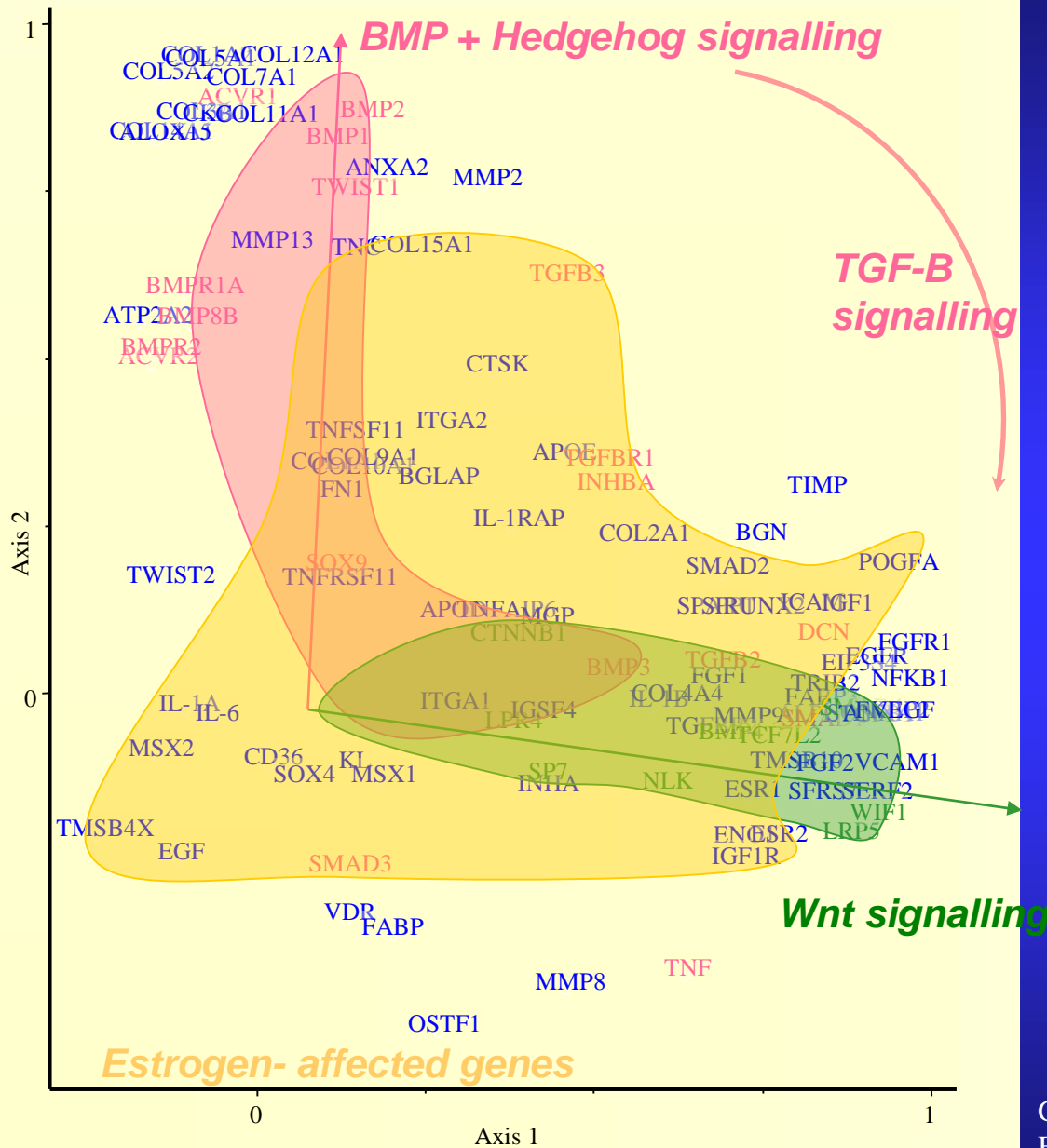


Gyurjan J et al, Mol Genet Genomics 2007. 277:221-235.
Borsy A et al, Mol Genet Genomics. 2009. 281(3):301-313.
Stéger V et al, Mol Genet Genomics, 2010. 284:273-287.
Bana NA et al, Mol Genet Genomics. 2018 Jan 2. doi:
10.1007/s00438-017-1412-3.

A porotikus (kék) és kontroll (piros)
minták keveredése referencia gének
esetén

Jelátviteli utak

Főkomponens analízis y

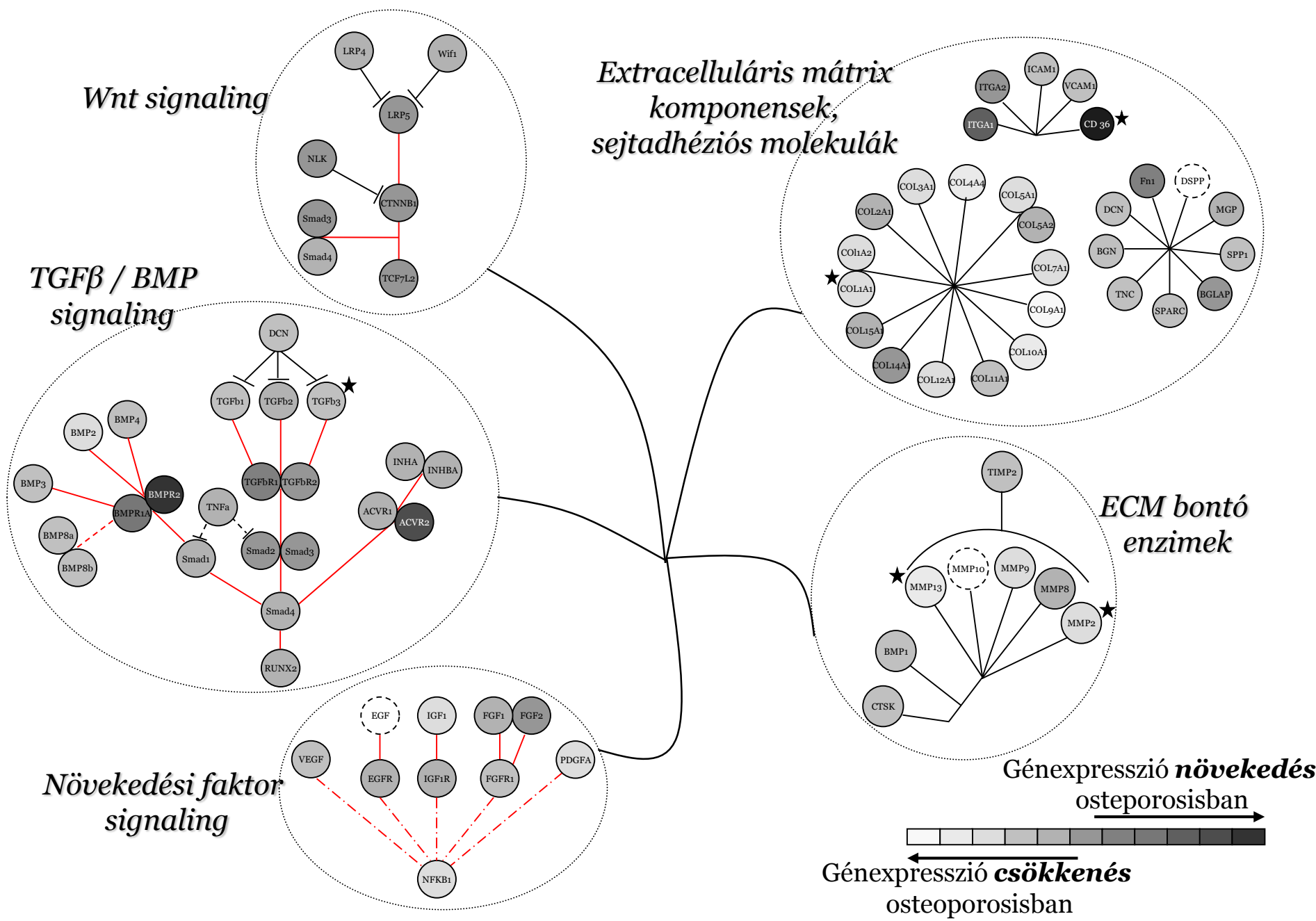


Wnt génjeink:

- LRP5
- LRP4
- NLK
- CtnnB
- TCF7L2
- SP7
- WIF1

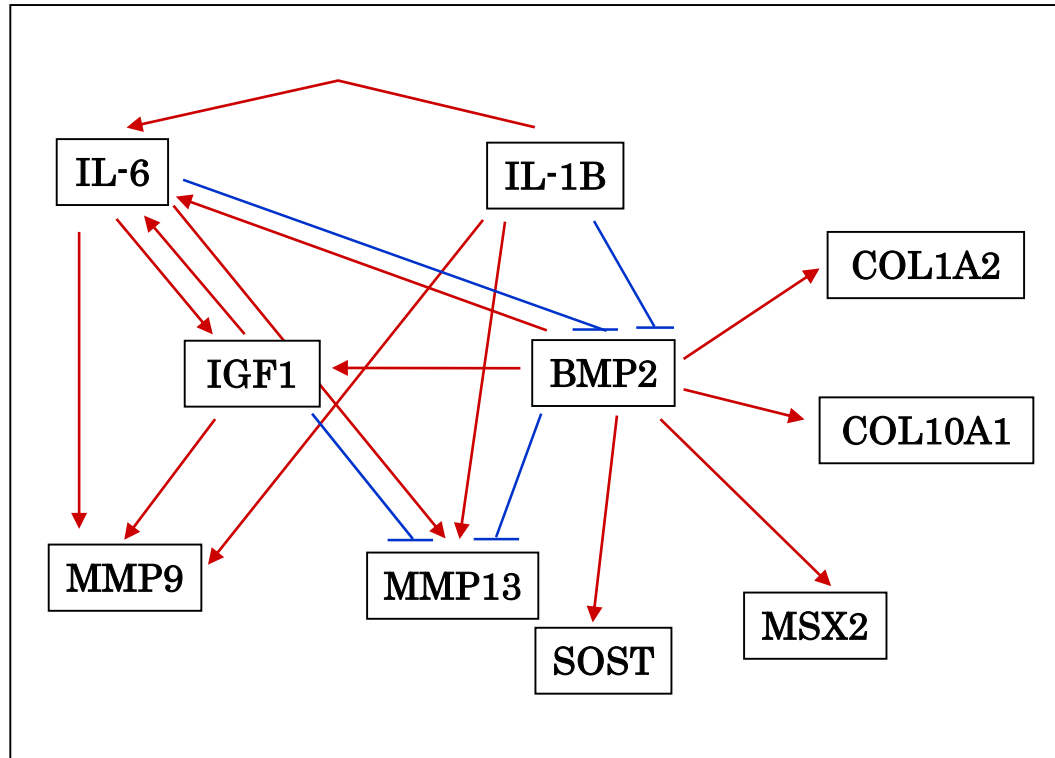
Humán vizsgálatok

A gének csoportosítása szignál útvonalak ill. funkció szerint

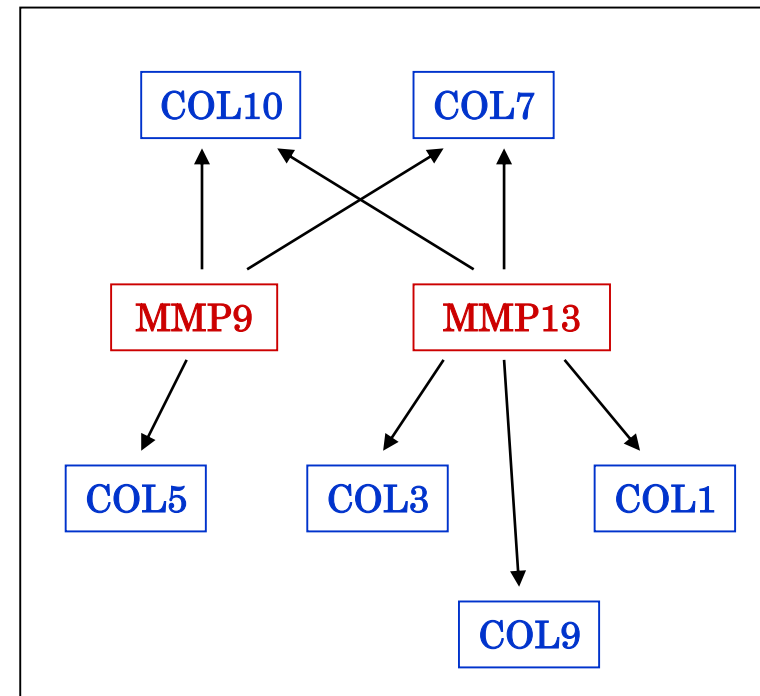


Interakciós hálózatok – Interaktomika szint

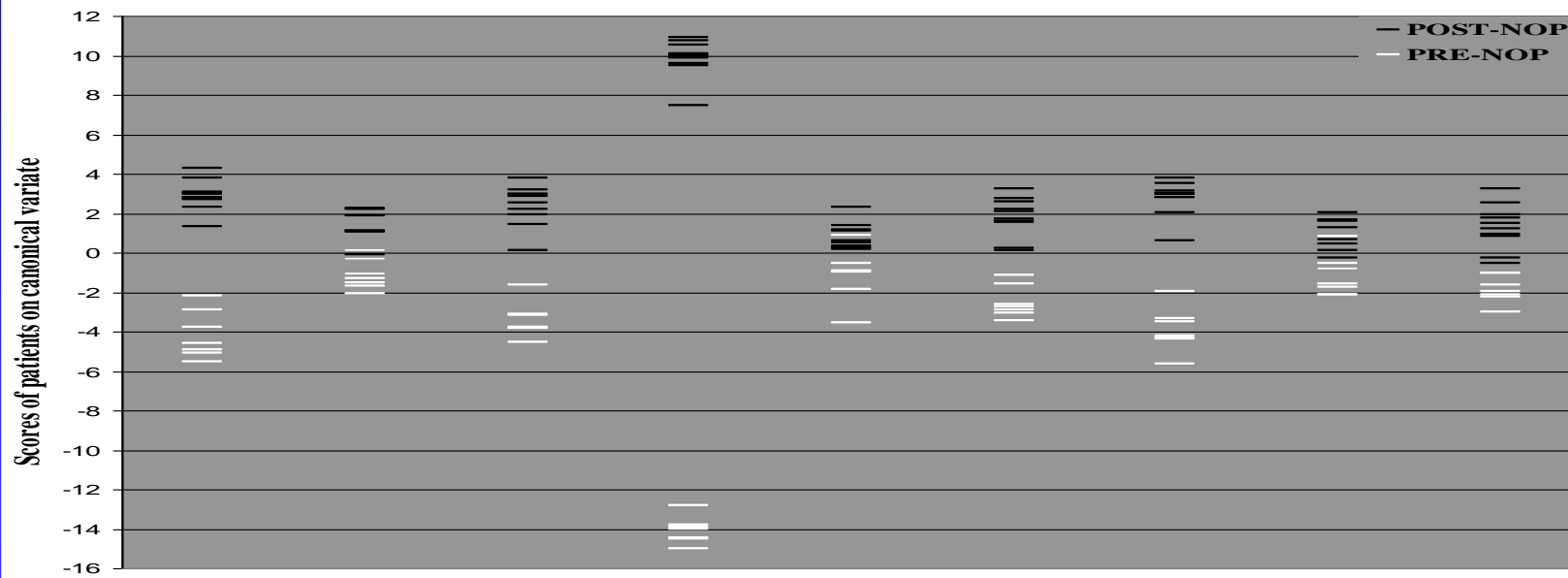
Protein ill. RNS szintű regulációs kapcsolatok



Enzim – Szubsztrát kapcsolatok



Canonical variates analysis



ECM ($p \leq 0.05$)		TGFB/BMP ($p \leq 0.05$)		ER-alpha		ER-beta		Lipid metabolism		Growth factors/ MAPK		TGFB/activin/nodal		WNT pathway		BMP pathway	
Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV	Gene name	Corr. with CV
BGLAP	0.720	TGFB3	0.981	MMP9	0.250	COL7A1	0.041	FABP4	0.384	IGF1	0.082	TGFB3	0.731	TCF7L2	0.878	SMAD4	0.717
MGP	0.624	TGFB2	0.723	IGF1	0.079	VEGF	-0.040	APOD	0.296	VEGF	-0.044	SMAD4	0.638	LRP4	0.615	BMPR1A	0.570
COL15A1	0.520	SMAD4	0.711	VEGF	-0.042	BMP4	-0.154	ALOX15	0.275	IGF1R	-0.132	TGFB2	0.536	NLK	0.591	BMP3	0.481
FN1	0.482	TGFB2	0.702	BMP4	-0.162	TNF	-0.175	LRP5	0.222	FGF2	-0.303	TGFB2	0.523	WIF1	0.502	BMP2	0.425
COL2A1	0.476	BMPR1A	0.678	TGFB1	-0.188	TGFB1	-0.179	FABP3	-0.183	NFKB1	-0.376	TGFB1	0.383	CTNNB1	0.252	BMPR2	0.292
MMP13	0.452			CTNNB1	-0.192	COL11A1	-0.309	APOE	-0.377	EGFR	-0.424	INHBA	0.375	LRP5	0.219	BMP4	0.179
COL12A1	0.412			BMP2	-0.384	TWIST1	-0.371	CD36	-0.472	PDGFA	-0.480	ACVR1	0.363			SMAD1	0.160
COL5A1	0.408			OPG	-0.385	SPP1	-0.412			FGF1	-0.523	ACVR2	0.281			BMP8A	0.082
COL3A1	0.381			MMP13	-0.459	BMP3	-0.426			FGFR1	-0.621	SMAD2	0.237			BMP8B	-0.437
COL5A2	0.339			PDGFA	-0.461	PDGFA	-0.439					TGFB1	0.186				
COL9A1	0.276			TGFB2	-0.545	SOX9	-0.448					INHBA	0.136				
BMP1	0.238			RUNX2	-0.631	FGF1	-0.480					SMAD3	-0.044				
				TGFB3	-0.740	TGFB2	-0.504										
						ALPL	-0.513										
						TGFB2	-0.525										
						RUNX2	-0.601										

Gyurjan J et al, Mol Genet Genomics 2007. 277:221-235.
 Borsy A et al, Mol Genet Genomics. 2009. 281(3):301-313.
 Balla B et al, Clin Immunol. 2009. 131:354-359
 Kósa JP et al, Menopause 2009. 16(2): 367-377.
 Kósa JP et al, J Clin Immunol. 2009. 29:761-768.
 Balla B et al, Immunológiai Szemle. 2009. 1:13-20.
 Kiss J et al, Am J Med Genet A 2010. 152A(9):2211-2220.
 Stéger V et al, Mol Genet Genomics, 2010. 284:273-287.
 Kiss j et al, Orv Hetil. 2010. 151(40):1656-65.
 Balla B et al, LAM 2010. 20(10):667-675.
 Balla B et al, Disease Markers 2011. 31(1):25-32.
 Bana NA et al, Mol Genet Genomics. 2018 Jan 2. doi: 10.1007/s00438-017-1412-3.

Mire használhatjuk a szarvastól tanultakat?

- Új diagnosztikus markerek kijelölése
- Új terápiás célpontok kijelölése

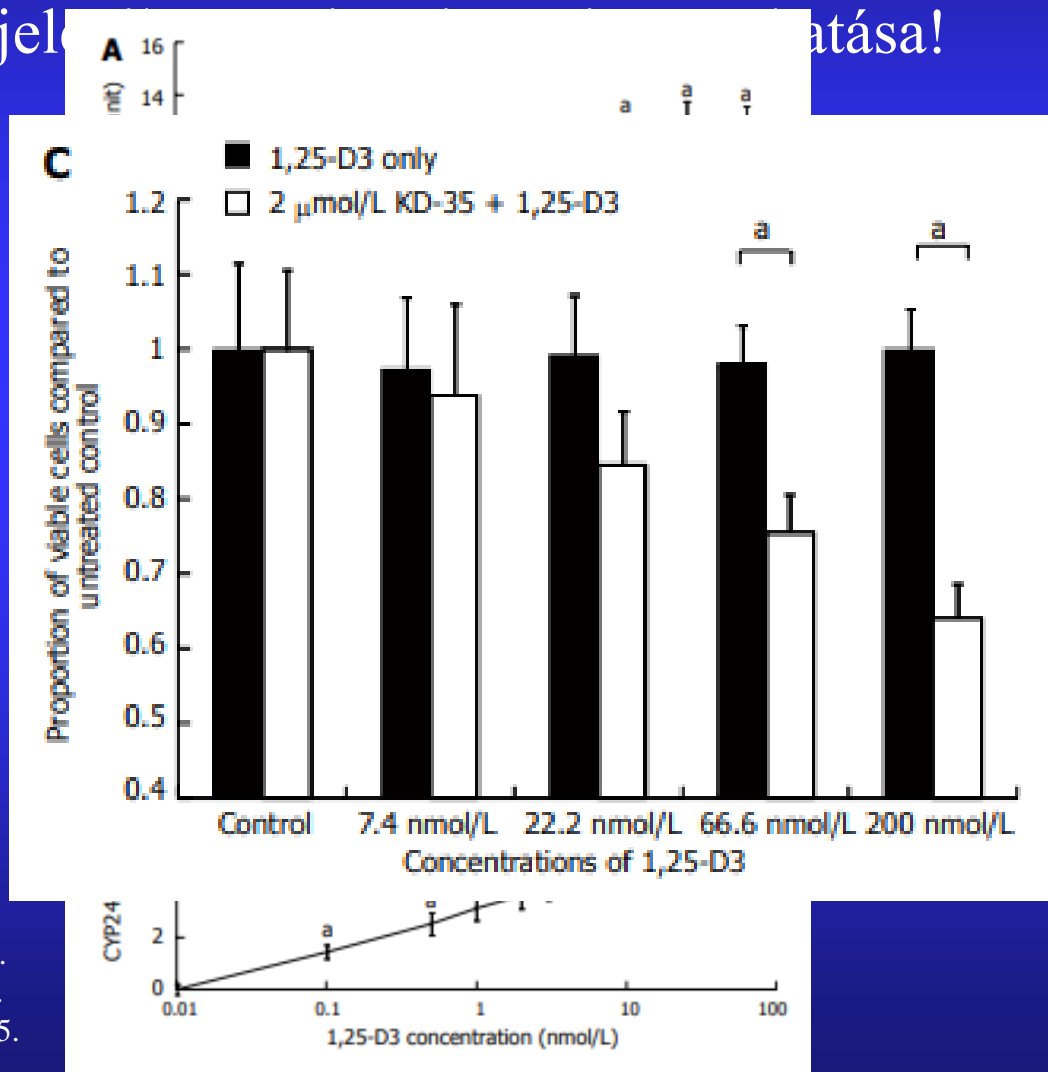
CYP24A1 expresszió

- A CYP24A1 (24-hidroxiláz) a calcitriol-neutralizáló enzim
- Fokozott expresszió colon és máj cc-ben
- CYP24A1 gátlásnál megjel

KD-35



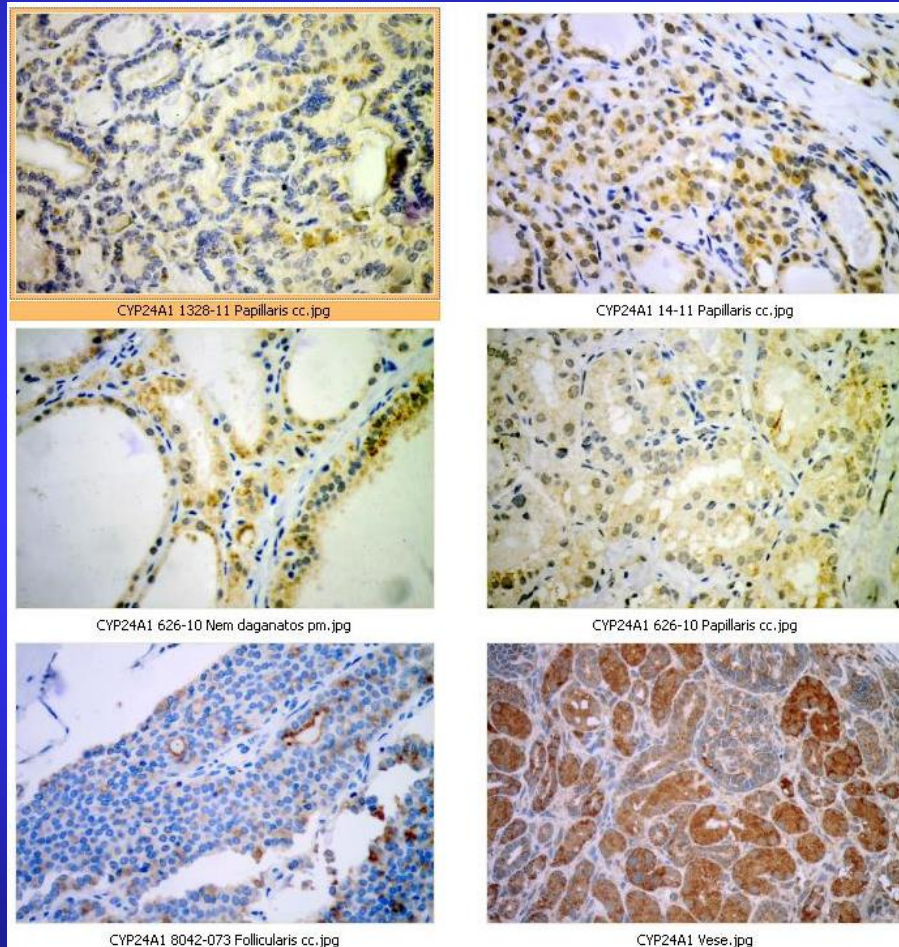
Wölfling János



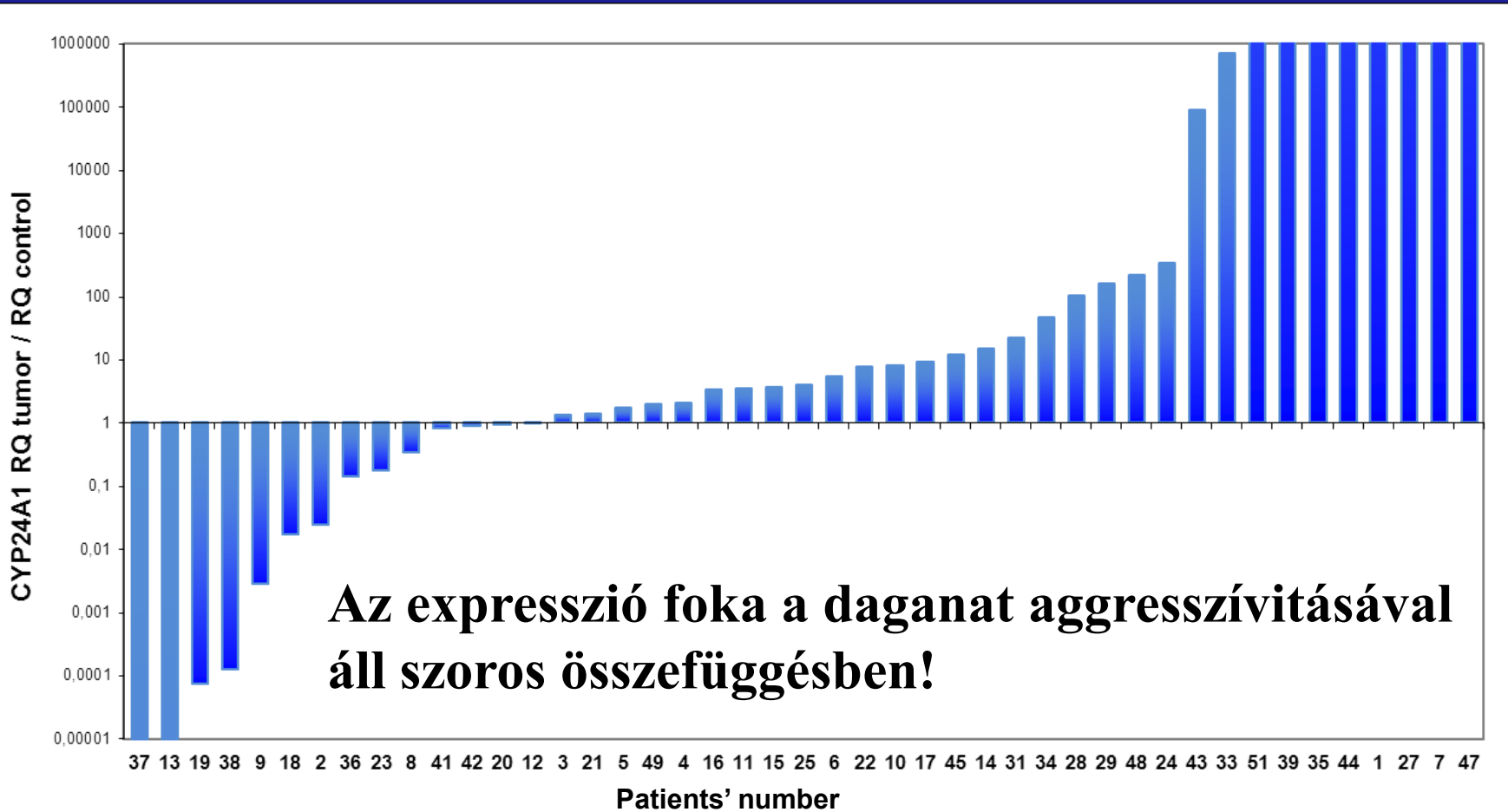
Horáth P et al, Magyar Belorvosi Archívum, 2011. 5:266-272.
Kosa JP et al, World J Gastroenterol 2013. 19(17):2621-2628.
Horvath HC et al, J Histochem Cytochem. 2010. 58(3):277-85.
Horvath E et al, Anticancer Res 2012. 32(11):4791-4796.

CYP24A1 expresszió pm tumorokban

- A CYP24A1 fokozott expressziója differenciált pajzsmirigy tumorokban!



A CYP24A1 gén expresszió változása 51 PTC-ben a normál pm szövethez képest



**A CYP 24 gátlása és/vagy D vitamin kezelés
hatékony anti-neoplasticus kezelés lehet
bizonyos daganatokban!**

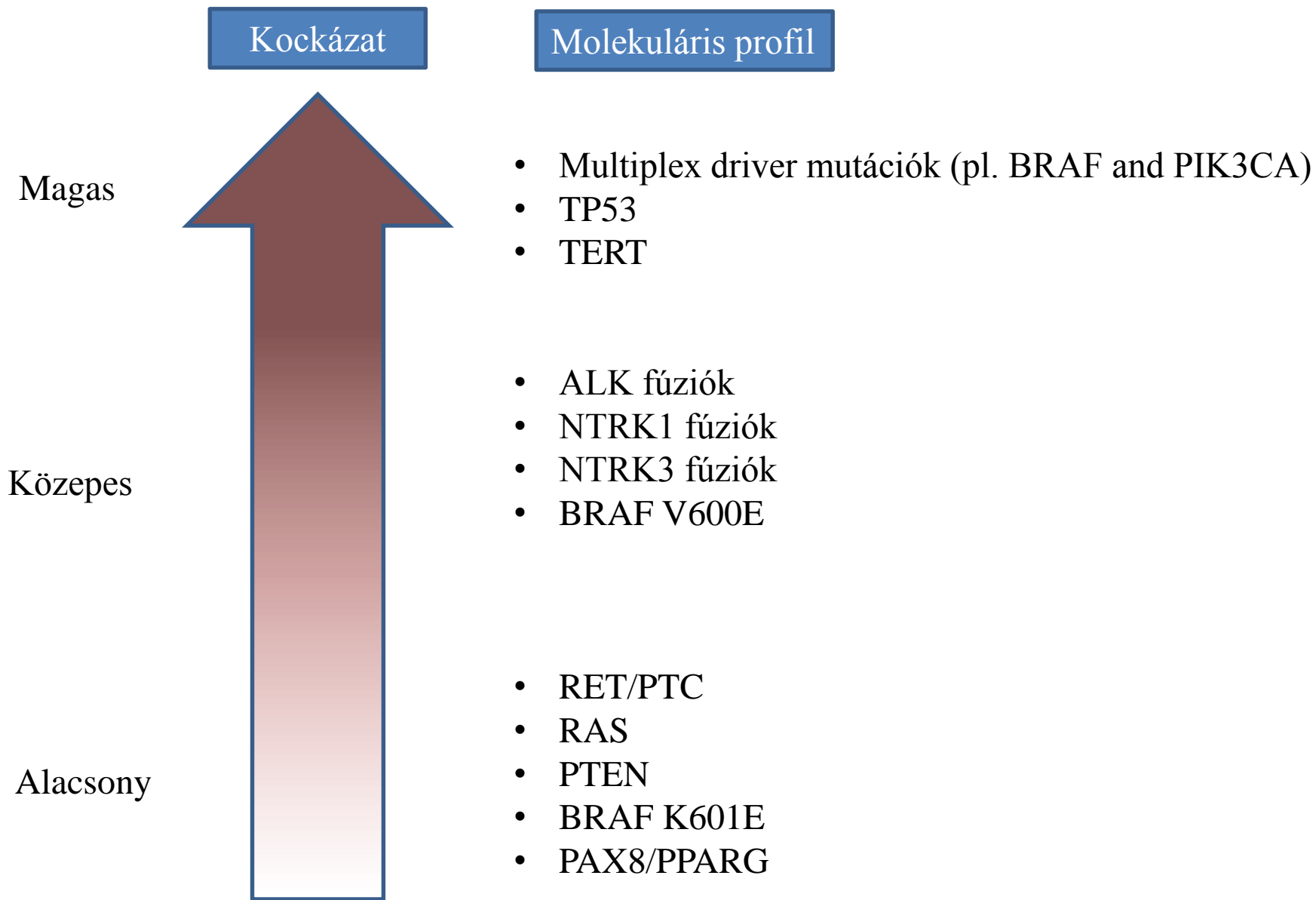
Genetikai eltérések DTC-ben Magyarországon

n=177	Age (year)
men (n=52)	52.9 ± 15.9
women (n=125)	50.3 ± 14.7

	Number of DNA samples	BRAF	HRAS	KRAS	NRAS
papillary cc.	154	59 (38,3%)	3 (1,95%)	1 (0,9%)	2 (1,3%)
follicular cc.	16	2 (16,7%)	1 (8,3%)	0	4 (25,0%)
other cc.	7	0	0	0	1 (14,3%)
normal tissue	163	0	0	0	0
total	340				

	Number of RNA samples	RET/PTC1	RET/PTC3
papillari cc.	97	7 (7,2%)	2 (2,1%)
follicular cc.	16	0	0
other cc.	7	0	0
normal tissue	120	0	0
total	240		

Daganat kockázat a molekuláris profil alapján



Pajzsmirigy hideg göbök követése 7 évig



Genetikai variációk	Frekvencia
BRAF	39
NRAS	23
HRAS	9
KRAS	1
RET/PTC3	1
	73 (9%)

- 779 citológiaiilag benignus FNAB minta gyűjtése
- Genetikai tesztelés
- 7 éves követés
- Genetikai eltérések és a malignitás incidenciájának követése
- Genetikai variációk megjósolják a malignus transzformációt?

57 tumor

27-ben genetikai eltérés (48%)

Specifititás: 93.6%, szenzitivitás 47.4%

negatív prediktív érték: 95.8%

pozitív prediktív érték: 37.0%

ThyroCan™

Target gene	Analysis method
BRAF	targeted NGS, mutation analysis
KRAS	targeted NGS, mutation analysis
NRAS	targeted NGS, mutation analysis
HRAS	targeted NGS, mutation analysis
TERT	targeted NGS, mutation analysis
RET	targeted NGS, mutation analysis
TP53	targeted NGS, mutation analysis
AXIN1	targeted NGS, mutation analysis
APC	targeted NGS, mutation analysis
IDH1	targeted NGS, mutation analysis
SMAD4	targeted NGS, mutation analysis
MET	targeted NGS, mutation analysis
CTNNB1	targeted NGS, mutation analysis
PIK3CA	targeted NGS, mutation analysis
DICER1	targeted NGS, mutation analysis
VHL	targeted NGS, mutation analysis
PTEN	targeted NGS, mutation analysis
LPAR4	targeted NGS, mutation analysis
EIF1AX	targeted NGS, mutation analysis
GAS8-AS1	targeted NGS, mutation analysis
TSHR	targeted NGS, mutation analysis
AKT1	targeted NGS, mutation analysis
GNAS	targeted NGS, mutation analysis
TG	control gene-expression
PTH	control gene-expression

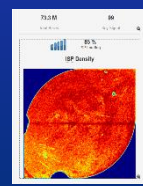
➤ NGS alapú módszer

➤ Jó prediktív érték

Szenzitivitás: 79%
Specificitás: 86%
Pozitív prediktív érték: 89%
Negatív prediktív érték: 75%

lási idő

- 23 rák gén + 2 szöveti kontroll gén
- 540 mutáció + 2 expresszió
- Platform: Ion Torrent PGM.



Pm molekuláris tesztek

Rosetta GX Reveal Rosetta Genomics, Inc.	Afirma GEC Veracyte	ThyGenX/ThyraMIR Interpace DX	ThyroSeqv2 CBLPATH/UPMC
miRNA Classifier containing 24 miRNAs (miRNAs are highly stable)	mRNA Classifier (mRNA is not stable and degrades over time)	Mutation Panel + miRNA classifier containing 10 miRNAs	Next-gen Mutation Panel Thyroid content control
Test is run off of an existing smear or ThinPrep Slide - No additional FNA or repeat biopsy is required	4 passes are required (2 for cytology and 2 for the GEC)	1 dedicated FNA pass collected in special preservative Also offering testing off of smears	1-2 drops of thyroid FNA in provided collection tube.
No special shipping requirements	Must be shipped on cool packs	No special shipping requirements	Ship with cool pack.
7-10 Day TAT	14 Day TAT (cytology + Afirma GEC)	14+ Business Day TAT	7-10 Day TAT
85% Sensitivity	94% NPV** (24% ROM in study – Begins to decline with higher ROM)	94% NPV***	94 – 98% NPV
90% NPV	92% Sensitivity**	89% Sensitivity*** (This validation study has been criticized because it looks at the old mitiniform oncogene panel and not ThyGenX)	90% Sensitivity
60% Specificity	47% PPV** (AUS/FLUS = 37%, FN=38%)	74% PPV*** (This validation study has been criticized because it looks at the old mitiniform oncogene panel and not ThyGenX)	71 – 83% PPV
72% PPV	52% Specificity**	85% Specificity*** (This validation study has been criticized because it looks at the old mitiniform oncogene panel and not ThyGenX)	92% Specificity
Can detect Medullary Thyroid Carcinoma	Can detect Medullary Thyroid Carcinoma	CANNOT detect Medullary Thyroid Carcinoma	Detects MTC
Medicare Reimbursement	Medicare Reimbursement	Medicare Reimbursement	Medicare Reimbursement
Patient Assistance Program (Rosetta Relief Program)	Patient Assistance Program (Afirma Access Program)	Patient Assistance Program (Compass Program)	Patient Assistance Program

A kalciumanyagcsere vizsgálata:

Honnan hová jutottunk?

- Új lehetőségek a csontanyagcsere betegségek diagnosztikájára és kezelésére.
- A kalciumanyagcserében résztvevő szereplők felhasználása a daganatos betegségek diagnosztikájában és gyógyításában.
- Erre alapozva komplett génpanelek kialakítása daganatkockázat megítélésére.

Köszönöm a figyelmet!

