A genetikai háttér szerepe a mozgató és támasztó szervrendszer működésében - Izomteljesítmény és tumorgenezis befolyásoltsága génexpressziós eltérések és nukleotid polyformizusok által

PhD tézis

Bozsódi Árpád

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Operatív Orvostudományi Tagozat

Témavezető: Dr. Med Habil Lazáry Áron PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Szabó Viktor PhD
Dr. Kósa János PhD

A Bíráló Bizottság Elnöke:
Prof. Dr.Lakatos Péter András PhD, MTA Doktora

A Bíráló Bizottság tagjai: Dr. Szalay Krisztián PhD
Dr. Tunyogi-Csapó Miklós PhD

Budapest
2026

1.Bevezetés

A sejtbiológia és a genetika gyorsan fejlődő alaptudományok, melyek jelentősége egyre fokozódik a mozgásszervi betegségek hátterének megismerésében. Számos kutatómunka célozza a mozgásszervi betegségek kezelését, míg a genomika tanulmányozása és fejlődésének szerepe a személyre szabott orvoslásban egyre hangsúlyosabb.

1.1.D vitamin receptor gén

A D-vitamin receptor (VDR) számos mozgásszervi fenotípus széles körben vizsgált jelölt génje. Többször kimutatták, hogy a VDR polimorfizmusai összefüggésben állnak a csontsűrűséggel és a törés kockázatával. A csontritkulásos törések összefüggenek az esések gyakoriságával, ami a VDR genotípusokkal is összefüggésben állnak. Az eséseket a VDR közvetetten befolyásolja, polimorfizmusainak az izomműködésre gyakorolt hatása által.

1.2.Chordoma

A chordoma egy ritka primer malignus csonttumor, mely az egyetlen gerincoszlopból kiinduló daganat. A tumor kialakulásának molekuláris biológiai háttere nem teljesen ismert. A kordómával szemben alkalmazott klasszikus és új célzott kemoterápiás szerek hatástalansága összefüggésben állhat a daganat összetett és heterogén onkogenezisével, amelyet

mérsékelt szomatikus mutációs ráta, ugyanakkor – csak bizonyos kromoszómakarokat érintő vagy kromotripszist eredményező – magas fokú genominstabilitás jellemez. Ezek a változások nemcsak a fehérjekódoló géneket, hanem a nem kódoló RNS-géneket is érinthetik, amelyek számos molekuláris hálózatot szabályoznak transzkripciós vagy poszttranszkripciós szinten. A mikroRNS-ek és a hosszú, nem kódoló RNS-ek a normál sejt- és szöveti homeosztázis kulcsfontosságú szabályozói, mivel pedig bizonyítottan fontos szerepet játszanak a daganatképződésben, széles körben vizsgálják őket a rákellenes gyógyszerfejlesztés új célpontjaiként.

2.Célkitűzés

2.1.D vitamin receptor gén

Kutatásunkban vizsgáltuk:

- hogy létezik-e összefüggés a VDR-polimorfizmusok és az izomteljesítmény között.
- a kiválasztott egynukleotidos polimorfizmusok szerepét a domináns és a nem domináns kéz szorítóerejének alakulásában.

2.2.Chordoma

Céljaink az alábbiak voltak:

- Új protokoll kidolgozása RNS izolálására frissen

fagyasztott chordoma mintákból

- Chordoma teljes transzkriptom szintű RNS-szekvenálásának elvégzése
- A keresztcsonti chordoma megváltozott miRNA-expressziós profiljának meghatározása a *nucleus pulposus* sejtekéhez képest, valamint a kordóma miRNA-mRNA hálózataira gyakorolt hatásának elemzése
- A kordóma onkogenezisében szerepet játszó lehetséges molekuláris célpontok meghatározása

3.Anyag és módszer

3.1.D vitamin receptor gén

Összesen 788 általános iskolás diákot vontunk be a vizsgálatba.

3.1.1.Genomiális DNS izolálása

A genomiális DNS-t a gyermekektől gyűjtött nyálmintákból izoláltuk. A nyálminták gyűjtésére az Oragene kit-teket használtunk (DNA Genotek Inc., Ontario, Kanada), majd a forgalmazó protokollja szerint izoláltuk a DNS-t**.**

3.1.2.Genotipizálás

A polimorfizmusok genotipizálásához a Sequenom MassArray platformját használtuk, a Helsinki Egyetem University

Molekuláris Gyógyászat Intézetének Core Facility laborjában (www.fimm.fi).

3.1.3.Kéz szorítóerő vizsgálata

Minden gyerek kéz szorítóerejét digitális Jamar dynamometer segítségével mértük meg, mindkét kéz esetében. A gyerekek a vizsgálat során ülő testhelyzetben, 90 fokban flektált alkarral háromszor ismételték meg a mérést. Az átlageredményeket N-ban (Newton) mértük és adatbázisban rögzítettük.

3.1.4.Statisztikai analízis

A polimorfizmusok között genetikai kapcsoltságot a Haploview 4.1 szoftverrel ellenőriztük. A vizsgált SNP-k között egy kettő és egy három tagból álló haploblokk különült el, ezek összefüggéseit a fenotípusokkal külön is vizsgáltuk. A haplotípusok hatásait a fenotípusokra a THESIAS programmal vizsgáltuk, log-likelihood ratio statisztikák kiszámolásával. Minden analízist a korra, a nemre, a testmagasságra és a testtömegre korrigáltunk. A $p<0.05$ értéket fogadtuk el szignifikánsnak vizsgálatunkban.

3.2.Chordoma

3.2.1Minta gyűjtés

8 chordoma (CH) és 8 nucleus pulposus (NP) szövetmintát gyűjtöttünk műtéti kezelésen átesett kaukázusi betegektől. A tumormintákat 3 férfi és 5 női alanytól vettük (átlagéletkor:

61,1±12,5 év). Az összes chordoma a keresztcsonti lokalizációjú volt és szövettanilag klasszikus chordomát igazoltak.

3.2.2.Nukleusz pulpozusz sejt tenyésztése

A nukleusz pulpózusz sejtek Dulbecco módosított Eagle Medium/Ham Nutrient F12 keverék tápoldatban voltak tenyésztve (Sigma-Aldrich), mely 20% borjú magzati szérumot tartalmazott (FBS, Sigma-Aldrich), valamint penicillin-streptomycin antibiotikumot (100UI és 100 mg/mL). A sejtek 25cm^2 –es flaskákban voltak tárolva 37ºC hőmérsékleten, nedvesített 5% (v/v) CO2 koncentrációs környezetben. A tápoldat cseréje 48 óránként történt friss oldatra, míg a sejtek elérték a 80%-os flaska telítettséget.

3.2.3.RNS izolálás

A frissen fagyasztott chordoma szövetből történő RNS izolálást, annak nehézségei miatt egy korábban általunk kifejlesztett protokoll segítségével végeztük.

3.2.4.Az RNS minőségi és mennyiségi kontrollja

A kapott RNS mennyiségi ellenőrzése NanoDrop spectrophotometer segítségével történt, míg a kapott RNS integritásának ellenőrzése Agilent 2100 platform használatával történt. A kapott eredmények alapján az RNS kiváló minőségű és mennyiségű volt minden mintában.

3.2.5.Könyvtár előkészítés és szekvenálás

Az RNA-seq esetében a szekvenáló könyvtárakat az Illumina TruSeq RNA SamplePrep v2 kittel, a kis RNA-seq-hez pedig az Illumina TruSeq Small RNA SamplePrep kittel állítottuk elő a szekvenáló könyvtárakat a gyártó utasításai szerint. Minden könyvtár indexelve volt, lehetővé téve a multiplex szekvenálást. Az RNA-seq könyvtárakat 2x100 bp-os páros végű olvasásként, a kis RNS-seq könyvtárakat pedig 1x50 bp-os egyvégű leolvasásként szekvenáltuk Illumina HiSeq 2000-en. A nyers adatokat a CASAVA 1.8.2 szoftverrel előfeldolgoztuk (konvertál*). .bcl fájlokat *.fastq.gz files=tömörített FASTQ fájlokba), és a demultiplexelt, fastq.gz fájlokat eredményezte az összes további elemzésben.

3.2.6.Az RNS Új generációs szekvenálási adatainak bioinformatikai elemzése

A legtöbb bioinformatikai elemzéshez vagy a nyilvános Galaxy Main szervert vagy a Galaxy Mississippi szervert használtuk (https://usegalaxy.org/, https://mississippi.snv.jussieu.fr/). A nyers adatok szekvenálási minőségét először a FASTQC segítségével ellenőriztük. Az adatok előfeldolgozása Trimmomatic (RNA-seq) és Adapter clipping + Trimmomatic használatával történt 19-25 nt (kis RNS-seq) méretválasztással. Az RNS-seq egy mintára (CH4) sikertelen volt, valószínűleg az indexszekvencia keveredése vagy

a könyvtár-előkészítés során fellépő hibás jelölés miatt, ami a demultiplexelés után hiányzó fájlt eredményezett, de a kis RNS-szekvencia ennél a mintánál is sikeres volt. A FASTQC-alapú minőség-ellenőrzési elemzés alapján az összes kis RNS-seq és RNA-seq leolvasás kiváló minőségű volt, és a könyvtárak a várt teljes olvasási számmal rendelkeztek.

Az előfeldolgozott RNS-seq adatokat a hg19 referencia genomhoz igazítottuk TopHat2 segítségével, és az olvasási számláló táblázatot a Featurecounts segítségével készítettük el. Az előfeldolgozott kis RNS-szekvencia adatokat Chimira segítségével igazítottuk a humán miRNS hajtűszekvenciákhoz, és a kapott sima számtáblázatot használtuk a következő lépésekben. Csak azokat a miRNS-eket vettük figyelembe, amelyeknek a minimális átlagos leolvasási száma ≥ 5 a CH vagy az NP mintákban. A Featurecounts táblázatok minden értékéhez 1-es értéket adtunk a nulla értékek kiküszöbölése érdekében. Differenciális génexpressziós analízist végeztünk EdgeR-rel a beolvasási számlálótáblázatok segítségével, hierarchikus klaszterezést euklideszi távolságmértékkel és átlagos kapcsolódást végeztünk a ClustVis-szel, a relatív expressziós szintek hőtérképét pedig GraphPad Prism-mel. A főkomponens elemzést DESeq2-vel végeztük.

3.2.7.miRNS jelátviteli útvonal

A differenciálisan expresszált miRNS-eket az EdgeR eredménytáblázatából választottuk ki a következő szűrők használatával: FDR (korrigált p-érték) ≤ 0,05, |log2FoldChange| ≥ 3. A felül- vagy alulszabályozott miRNS-ek azok voltak, amelyek |log2FoldChange| ≥ 5. A differenciálisan expresszált mRNS-eket az EdgeR eredménytáblázatából választottuk ki, a következő szűrők használatával: FDR (korrigált p-érték) ≤ 0,01, |log2FoldChange| ≥ 2 és diszperzió ≤ 1,54. A funkcionális annotáció nélküli géneket és a részleges cDNS-géneket eltávolították a listáról. A differenciálisan kifejeződő miRNS-ek célpontjait a Targetscan 7.1 algoritmussal (http://www.targetscan.org/vert_71/) jósoltuk meg. A célgének funkcionális osztályozására szolgáló génontológiai (GO) annotációk a Panther osztályozási rendszeren (http://pantherdb.org/) és szakirodalmi kereséseken alapultak. Az útvonalelemzést a Consensus PathDB humán, 32-es kiadásával (génkészlet felülreprezentáltsági elemzése) végeztük (http://cpdb.molgen.mpg.de/CPDB) .

3.2.8.Valós idejű kvantitatív PCR elemzés és adatfeldolgozás

A kiválasztott miRNS-ek és mRNS-ek expresszióját valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel validáltuk. A TaqMan™ vizsgálati azonosítók és az RT-qPCR protokoll részletei a Kiegészítő adatokban találhatók. A miRNS adatok

normalizálásához teszteltük az RNU44-et, az RNU6B-t, a miR-106b-t és a miR-30d-t, és a NormFinder szoftverrel végzett elemzés alapján az RNU44-et választottuk a legjobb referenciagénnek. Az mRNS adatok normalizálásához referenciagénként a GUSB-t, GAPDH-t, Cyclophilin A-t (PPIA), RPLP0-t és HPRT1-et teszteltük, és a PPIA-t választottuk a legjobb referenciagénnek. A mintákat StepOne™ Real-Time PCR rendszeren (Applied Biosystem®) mértük. A nyers adatok elemzését a StepOne Software v2.2.2 (Applied Biosystem®) használatával végeztük. Cutoff Ct értékek (a mennyiségi meghatározás határa) minden egyes TaqMan® vizsgálathoz Ct=37 értékre állítva. Az ezen érték feletti Ct-k vagy a „nem észlelt" értékek egységesen Ct=40-re lettek beállítva. A normalizált expressziós értékeket a 2-dCt módszerrel számítottuk ki. A statisztikai analízist GraphPad Prism programmal végeztük, Mann-Whitney U-teszttel a normalizált expressziós értékeken.

3.2.9.Összehasonlító gén expressziós vizsgálat

Az iniciális gén-expressziós analízis Cuffdiff szűrési algoritmus használatával történt. A differenciációs gén expressziós analízishez DeSeq2 program volt használva, ami bizonyítottan magas specifitisású azonban alacsonyabb szenzitivitású. Az alacsony szenzitivitás kiküszöbölése érdekében egy jó szenzitivitású EdgeR programot használtunk kiegészítésként. A

folytatásban kizárólag a mindkét program által észlelt gén expressziós változásokat vizsgáltuk tovább.

4.Eredmények

4.1.D Vitamin receptor gén

Az átlagos kézfogás erőssége 147,5 + 42,1 Newton (N) és 137,3 + 38,3 N volt a domináns és nem domináns kezeknél a kohorszunkban, és a két kéz erőssége közötti korreláció kiváló volt ($r = 0,83$, $p < 01$). A HGS mind a domináns, mind a nem domináns kezekben normálisan oszlott el a mintapopulációban ($p > 0,05$ a Kolmogorov–Smirnov tesztben). Az életkor, a súly, a magasság és a nem korrelált mindkét kéz markolatának erejével, és mind a négy demográfiai paraméter szignifikáns prediktornak bizonyult a többváltozós regressziós modellekben. A mérési módszer megbízhatónak bizonyult, amelyet mindkét kéz magas ICC-értéke jellemez (0, 98 és 0, 95 domináns és nem domináns kezek esetén).

4.1.1.Genetikai összefüggések

Szignifikáns összefüggéseket találtunk három egyedi SNP és a Kéz szorítóerő között. Az rs4516035 (A1012G) polimorfizmus „TT” genotípusa társult a legmagasabb, míg a „CC” genotípus a legalacsonyabb szorító erőt igazolt mindkét kézben ($p = 0,009$ és

$p = 0{,}034$ domináns és nem domináns kezek esetén). Az rs1544410 „AA” genotípust hordozó gyermekeknél (BsmI, $p = 0{,}010$)) és az rs731236 „CC” genotípusú hordozóinál (TaqI, $p = 0{,}038$) nagy domináns kézfogást találtak.

Három, 1%-nál nagyobb gyakoriságú haplotípust azonosítottak a VDR haploblokkon belül, amely a gén 3′ részén található. A VDR haplotípusok szignifikáns összefüggést mutattak a kézfogás erejével mindkét kéznél ($p < 0{,}005$ és $p < 0{,}01$ a domináns és nem domináns kezek esetében) Az „ACT” és „GTT” haplotípusok közötti kézfogás erősségének átlagos különbsége 12,1 N és 10,0 N volt a domináns és a nem domináns kezek esetében.

Figyelembe véve a HGS átlagát a domináns kézben, mintaméretünk 80%-os teljesítményt biztosított a 10 N különbség kimutatására egy kovariáns korrigált additív genetikai modellben 0,373 MAF esetén.

4.2.Chordoma

A TopHat2 sorozatban a párosított végek statisztikai analízise során igazolódott, hogy a szekvencia fileok átlagosan 18330864 teljes leolvasáson összességében 77% pontosságú feltérképező szekvencia meghatározására voltak képesek. Továbbá átlagosan a vég a véghez történő párosítás során 13325254 lépésben történt párosítás 72,7% egybehangzóan határozta meg a szekvencia illesztésének a pontosságát. A transzkriptom elfogadott

olvasásainak száma a tumor mintákban 24-26 szoros, míg a nukleusz pulpózusz mintákban 20-27 szeres lefedettséget igazolt, melynek pontossága a vizsgálat előtt is a szándékozott elérési számnak minősült. Egyes kontroll minták esetében az alacsonyabb lefedettséget igazoló (NP7, NP11, NP13) értékek elfogadhatóak, ugyanis a kontroll mintákban a gén expressziós variációk, kromoszómális aberrációk száma rendkívül csekély. A genetikai információ feltérképezési rátája minden mintában meghaladta a követelményképpen meghatározott 60%-ot. A sorozatok párosítási rátája minden mintában szintén meghaladta a 60%-ot.

4.2.1A miRNS-ek expressziós profilja

Elemzésünk 126 differenciálisan expresszált miRNS-t azonosított, amelyek közül 74 miRNS-t felfelé, 52-et pedig leszabályoztunk a chordomában. A miRNS differenciális expressziós profilján alapuló PCA-elemzés a CH-minták és az NP-minták egyértelmű elválasztását mutatta ki, és a CH4 chordoma-mintát is kiugró értékként azonosította. A diszregulált miRNS-ek 52%-a (N=66) intragén volt, és ezek 39%-a (26 miRNS) a gazdagénekkel együtt szabályozott.

4.2.2.Lehetséges önmegújító molekuláris mechanizmusok azonosítása chordomában

Annak érdekében, hogy azonosítsuk azokat a géneket, amelyek a legvalószínűbb jelöltek a chordomában a differenciálisan

expresszált miRNS-ek általi szabályozásra, számos diszregulált gént választottunk ki, amelyek célpontjai lehetnek több diszregulált miRNS-nek, és a legjobb kumulatív súlyozott kontextus++ pontszámmal rendelkező célgéneket (pontszám≤-0,6) Ez a megközelítés számos korábban validált szabályozó mRNS/miRNS kölcsönhatást javasolt az LCOR/miR-199a-5p, MITF/miR-182-5p/miR-101/miR-148a-3p, HIF3a/miR-485-5p, HMGA1/miR- között. 142-3p, RASA1/miR-182-5p/miR-223-3p, RGS17/miR-182-5p és RICTOR/miR-142-3p. Az mRNS-célpontok funkcionális annotációja egy miRNS-mRNS hálózatot jósol meg, amely az LCOR transzkripciós faktor szabályozásán keresztül szabályozza a chordoma tumorok önmegújulási potenciálját, valamint a Hippo útvonal potenciális aktiválását a regulátorok, a TAOK és a MOB1 megcélzásával.

5.Következtetések

5.1.D Vitamin receptor gén

Kutatásunk eredményeként összefüggést találtunk a D-vitamin receptor gének polimorfizmusai és különböző izomcsoportok teljesítménye között.

- A BsmI (rs1544410) polimorfizmus A allélját találtuk a megnövekedett kéz szorítóerővel összefüggőnek. Ezt mind az egyedi SNP, mind a haplotípus vizsgálatok

alátámasztották. Az „A” allél megegyezik a tradicionálisan „B”-vel jelölt BsmI alléllal, melyet bizonyos vizsgálatokban – saját eredményeinkkel összhangban – megnövekedett izomteljesítménnyel találtak összefüggőnek.

- Az rs731236 (TaqI) polimorfizmus „C” alléljét tradicionálisan „t”-vel jelölik a publikációkban. Saját vizsgálatunkban ez az allél emelkedett szorítóerővel volt szignifikáns összefüggésben.
- A haplotípusvizsgálatok során azonban a gén 3’ végét lefedő rs1544410-rs731236-rs10783215 haploblokk mindkét kéz szorítóerejével szignifikáns összefüggést mutatott, jelezve azt, hogy a génszabályozásban valószínűsíthetően részt vevő génvariánsok kihatással lehetnek a kéz izomerejére függetlenül a környezeti hatásoktól

5.2.Chordoma

- A frissen fagyasztott kordómából történő RNS-izolálás eddig akadályokba ütközött a daganat nyákos állománya miatt. A jelen kutatás előnye, hogy a frissen fagyasztott daganatmintából történő RNS-izolálás nehézségeinek leküzdését követően a szerzőknek sikerült kidolgozniuk egy új RNS-izolálási protokollt,

amely lehetővé tette a kordóma teljes RNS-állományának szekvenálását

- Sikeresen végeztek új generációs szekvenálást szakrális chordomában a globális miRNA- és mRNA-génexpressziós változások együttes elemzése céljából.
- Sikeresen azonosítottunk számos, a chondroma és a nucleus pulposus között eltérő expressziót mutató miRNA-t; ezek közül 74 miRNA expressziója fokozott, 52-é pedig csökkent volt chordomában
- Sikeresen igazoltuk, hogy a Hippo-jelátviteli útvonal aktiválódása szerepet játszik a kordóma önmegújulási mechanizmusában.

Bibliográfia

Tézissel összefüggő publikációk:

Muscle strength is associated with vitamin D receptor gene variants.
Bozsodi A, Boja S, Szilagyi A, Somhegyi A, Varga PP, Lazary A. J Orthop Res. 2016 Nov;34(11):2031-2037. doi: 10.1002/jor.23220. Epub 2016 Mar 14.

Potential molecular mechanism in self-renewal is associated with miRNA dysregulation in sacral chordoma - A next-generation RNA sequencing study.
Bozsodi A, Scholtz B, Papp G, Sapi Z, Biczo A, Varga PP, Lazary A. Heliyon. 2022 Aug 13;8(8):e10227. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10227. eCollection 2022 Aug.

Tézissel nem össefüggő publikációk:

Primary Spinal Tumor Mortality Score (PSTMS): a novel scoring system for predicting poor survival.
Szövérfi Z, Lazáry A, **Bozsódi A**, Klemencsics I, Eltes P, Varga PP
Spine J. 2014 Mar 17. pii: S1529-9430(14)00250-2. doi: 10.1016/j.spinee.2014.03.009.

Cross-cultural adaptation and validation of the Hungarian version of the Core Outcome Measures Index for the back (COMI Back).
Klemencsics I, Lazary A, Valasek T, Szoverfi Z, **Bozsodi A**, Eltes P, Fekete TF, Varga PP.
Eur Spine J. 2015 Jan 9

Validation of the Hungarian version of the Roland-Morris disability questionnaire.
Valasek T, Varga PP, Szövérfi Z**, Bozsodi A**, Klemencsics I, Fekete L, Lazary A.

Disabil Rehabil. 2015;37(1):86-90. doi: 10.3109/09638288.2014.909536. Epub 2014 Apr 21

[MEASURING THE FUNCTIONAL IMPAIRMENT OF THE LUMBAR SPINE]. Valasek T, Varga PP, Klemencsics I, Szövérfi Z**, Bozsódi Á**, Éltes PE, Lazáry Á. Ideggyogy Sz. 2015 Mar 30;68(3-4):135-41.

Clinical Decision Making: Integrating Advances in the Molecular Understanding of Spine Tumors.
Goodwin CR, Abu-Bonsrah N, Bilsky MH, Reynolds JJ, Rhines LD, Laufer I, Disch AC, **Bozsodi A**, Patel SR, Gokaslan ZL, Sciubba DM, Bettegowda C. Spine (Phila Pa 1976). 2016 Oct 15;41 Suppl 20:S171-S177. doi: 10.1097/BRS.0000000000001836.

Risk factors for surgical site infection in elective routine degenerative lumbar surgeries.
Klemencsics I, Lazary A, Szoverfi Z, **Bozsodi A**, Eltes P, Varga PP. Spine J. 2016 Nov;16(11):1377-1383. doi: 10.1016/j.spinee.2016.08.018. Epub 2016 Aug 9