

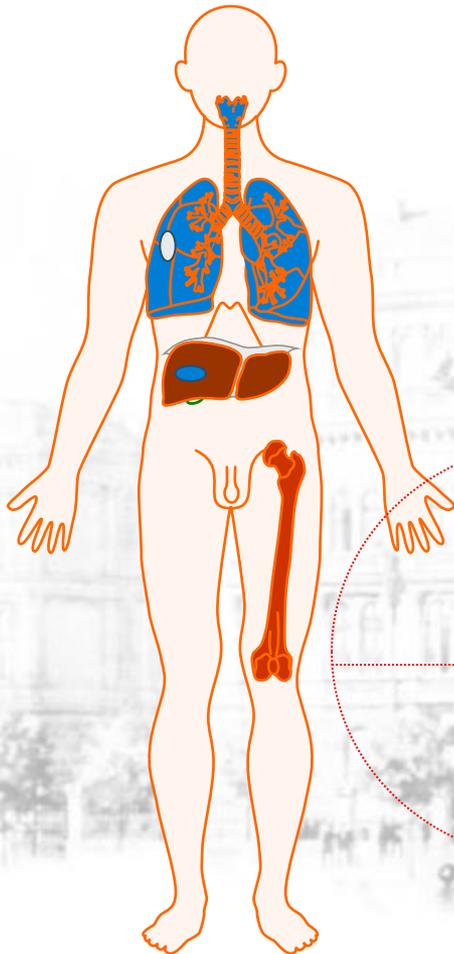
Modern Orvostudományi Technológiák a Semmelweis Egyetemen

Molekuláris Medicina a Terápiában

Dr. Tímár József

2011. november 15.

- A betegség molekuláris (genetikai) alapjainak feltárása
- A génhiba diagnosztikus kimutatása (teszt kidolgozása): Molekuláris patológia: **prognosztika, predikció**
- Génhibára, molekuláris diszfunkcióra alapozott un. Célzott terápia



Daganatok

- Tüdőrák
- Emlőrák
- Veserák
- Vastagbélrák
- Májrák
- Melanoma
- CML
- B-NHL

Daganatos beteg egyéb betegségei

- Metabolikus szindróma
- Nefrogén diabetes insipidus
- Agyi neurodegeneratív betegségek
(Parkinson, Alzheimer)
- Bakteriális szepszis



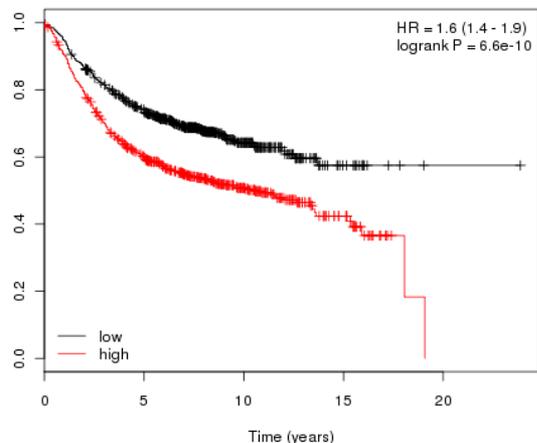
3.1. Célkeresztben a szolid daganat

- Disszeminált daganat kezelése az eredeti daganat genotípusára alapozva?
- **Az emlőrák kemoterápiás érzékenységének genomikai predikciója**
- **Kulka Janina, Győrffy Balázs**
- **II.sz Pathologiai Intézet, I.sz. Gyermekgyógyászati klinika**
- Molekuláris célpont-azonosítás májrákban
- Molekuláris célpont-azonosítás melanómában



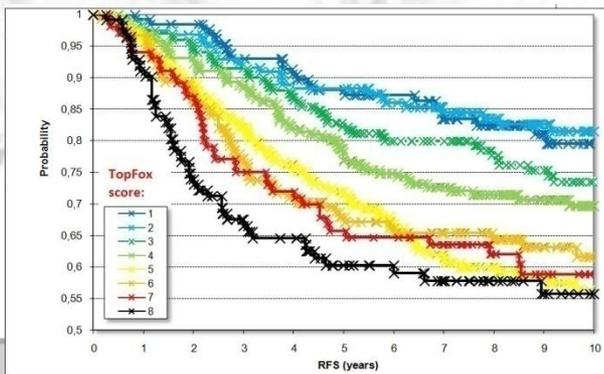
mammaPrint®

- minden emlőrák
- fagyasztott mintákra
- „TOPFOX tudja”
- FFPE mintákon is



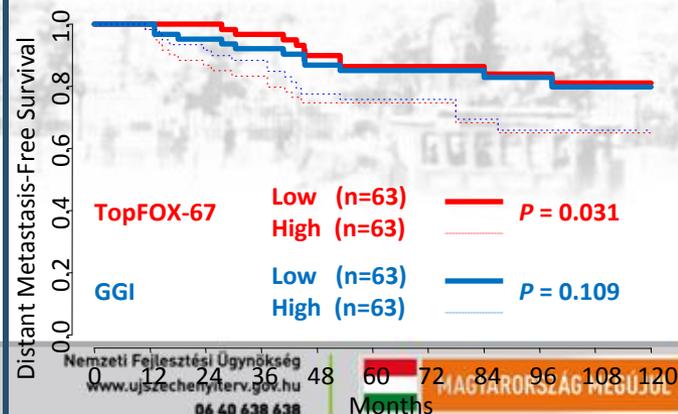
oncotype DX®
Breast Cancer Assay

- ER+ emlőrákok
- FFPE mintákra
- „TOPFOX tudja”
- az intermediate tipust is elválasztja



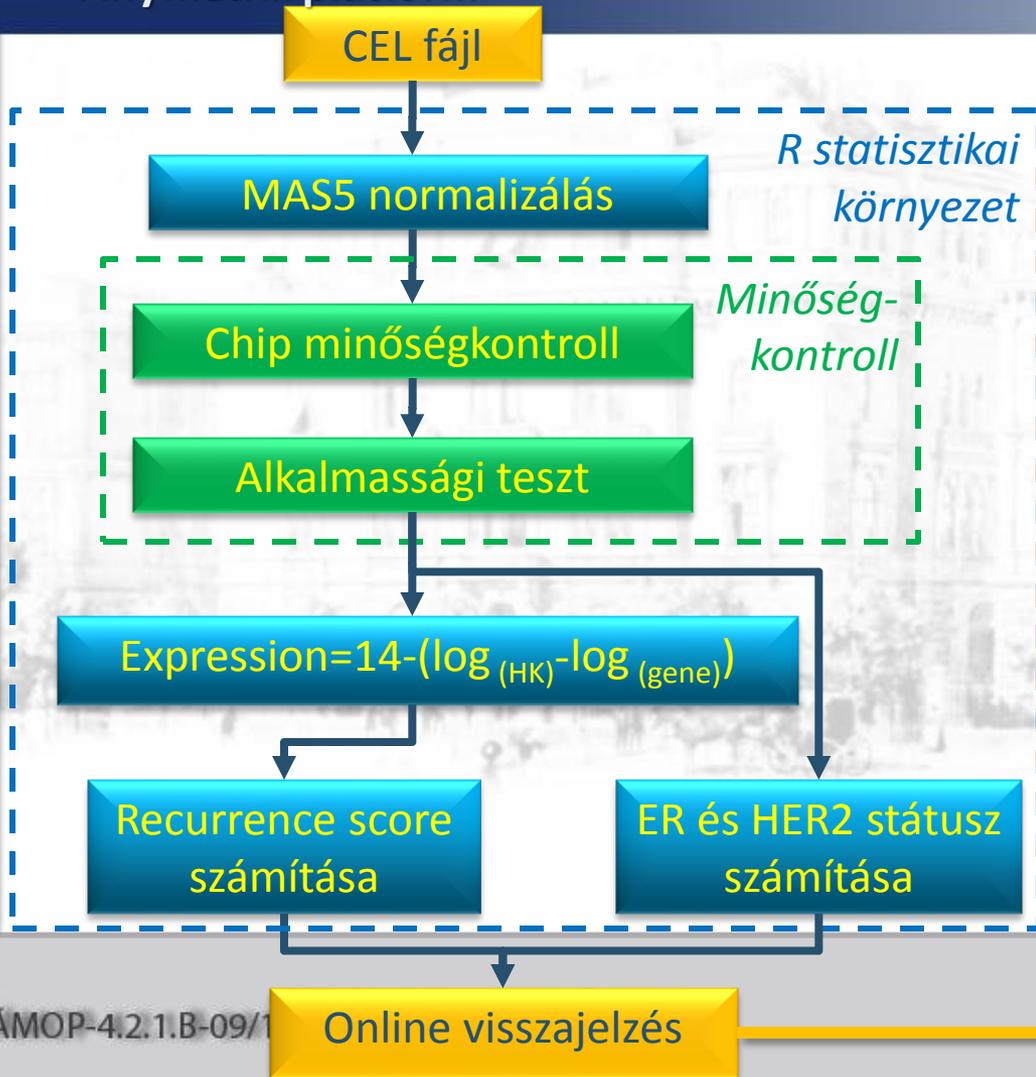
IPSOGEN
PROFILING BREAST CANCER

- grade 2 emlőrákok
- fagyasztott mintákra
- „TOPFOX” tudja
- tovább pontosít
- FFPE mintákon is



„Emlőrák microarray vizsgálatok validálása, prognosztikai feldolgoása”

Affymetrix platform



Patient ID: XXX

Age: 62

Lymph node status: Negative

Grade: 2

2010-09-28

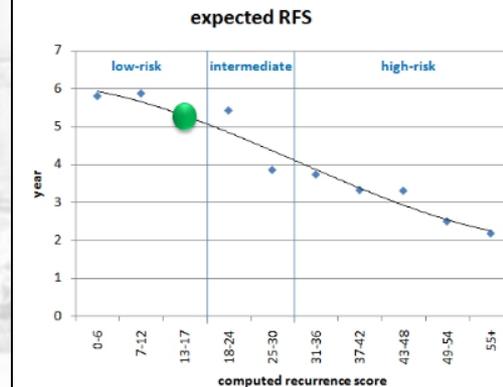
Microarray platform: HGU133A

Eligibility Test: passed.

Array Quality Test: passed.

Computed Recurrence Score: 14 (low risk)

The recurrence score can be used to predict the probability of distant recurrence in patients with breast cancer who have estrogen-receptor positive tumors with no lymph nodes involved:



ER status: Positive. (MAS5 normalized gene expression: 9108)

					X					
62.5	125	250	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
ER negative					ER positive					

HER2 status: Positive. (MAS5 normalized gene expression: 1266)

					X				
143.8	287.5	575	1150	2300	4600	9200	18400	36800	
HER2 negative					HER2 positive				

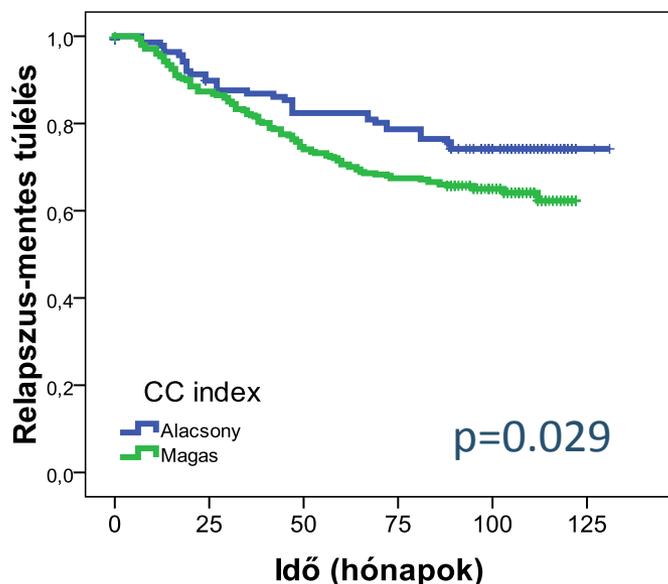
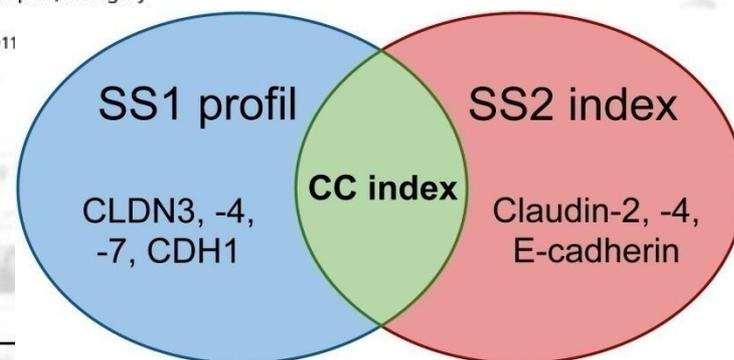
Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer

Attila M. Szasz,¹ Zsuzsanna Nemeth,¹ Balazs Gyorffy,² Mariann Micsinai,^{3,4} Tibor Krenacs,⁵ Zsolt Baranyai,⁶ Laszlo Harsanyi,⁷ Andras Kiss,¹ Zsuzsa Schaff,¹ Anna-Maria Tokes¹ and Janina Kulka^{1,8}

¹Second Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest; ²Research Laboratory of Pediatrics and Nephrology, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary; ³Center for Health Informatics and Bioinformatics, New York, New York; ⁴Department of Pathology and Yale Cancer Center, New Haven, Connecticut, USA; ⁵First Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest; ⁶Department of Surgery and Vascular Surgery, Uzsoki Memorial Hospital, Budapest; ⁷First Department of Surgery, Semmelweis University, Budapest, Hungary

(Received June 15, 2011/Revised August 8, 2011; August 16, 2011/Accepted August 22, 2011/Accepted manuscript online August 29, 2011)

- mRNS-szintű elemzés: claudin-3, -4, -7 és E-cadherin
- fehérjeszintű vizsgálat: claudin-2, -4 és E-cadherin
- kettő átfedéséből: **CC index**

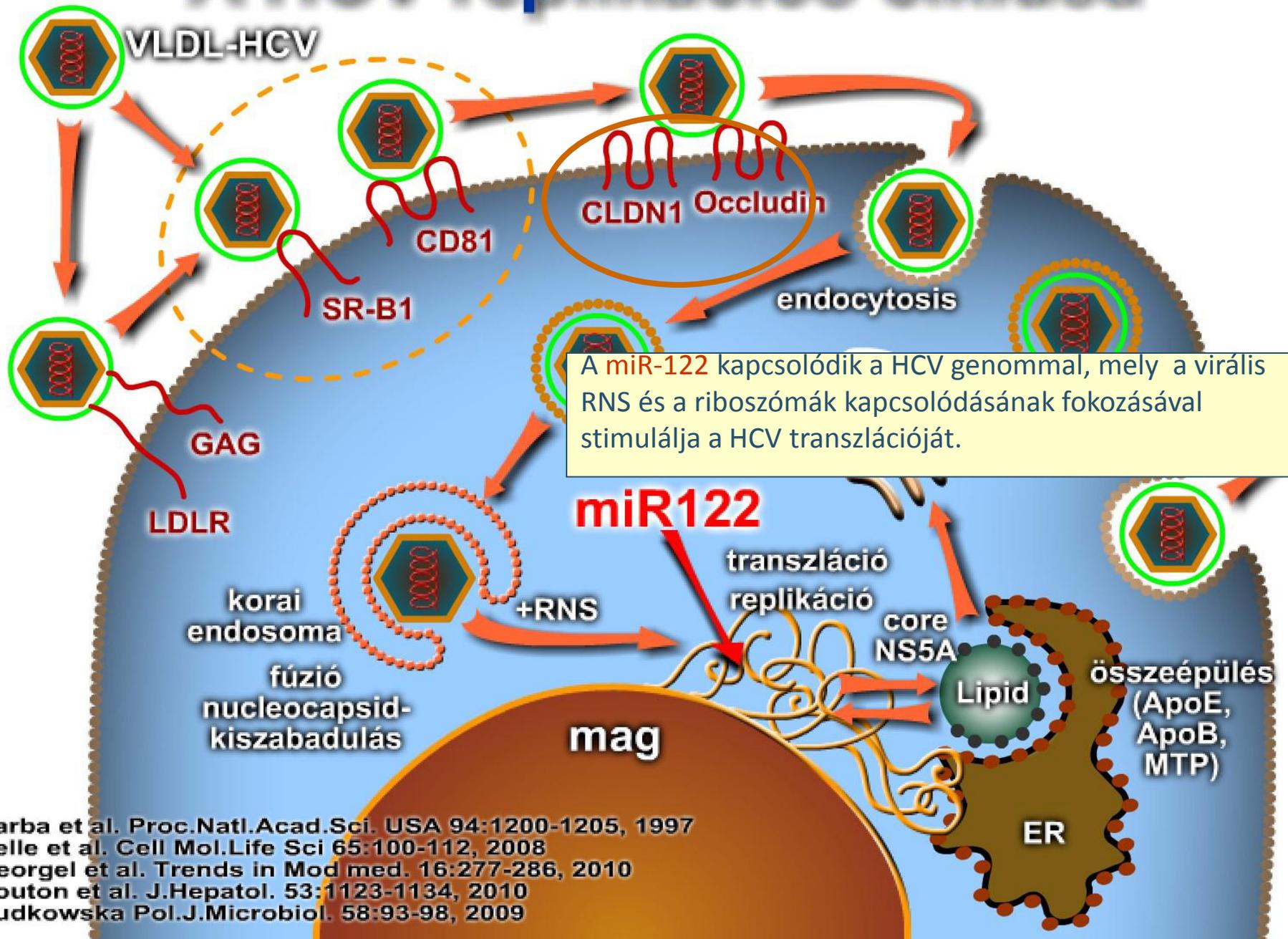


MULTIVARIÁNS TESZT, Paraméter:	p	HR	95%CI	
			Alsó	Felső
<i>CC index</i>	0.040	1.503	1.02	2.216
<i>Immunfenotípus</i>	0.001	1.064	0.59	1.918
<i>Érbetörés</i>	0.011	0.704	0.31	1.808
Nyirokcsomó-áttétek száma	0.091	0.791	0.6	1.038
Grade	0.767	1.037	0.82	1.32
Necrosis	0.232	2.233	0.72	8.435

3.1. Célkeresztben a szolid daganat

- Disszeminált daganat kezelése az eredeti daganat genotípusára alapozva?
- Az emlőrák kemoterápiás érzékenységének genomikai predikciója (Kulka Janina, Győrffy Balázs)
- **Molekuláris célpont-azonosítás májrákban**
- **Schaff Zsuzsa, Kiss András**
- **II.sz. Pathologiai intézet**
- Molekuláris célpont-azonosítás melanómában

A HCV replikációs ciklusa



Barba et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 94:1200-1205, 1997
Helle et al. Cell Mol.Life Sci 65:100-112, 2008
Georgel et al. Trends in Mod med. 16:277-286, 2010
Routon et al. J.Hepatol. 53:1123-1134, 2010
Budkowska Pol.J.Microbiol. 58:93-98, 2009

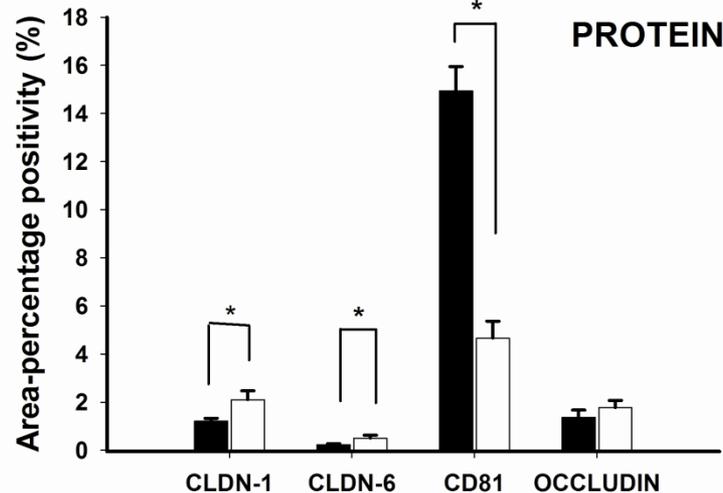
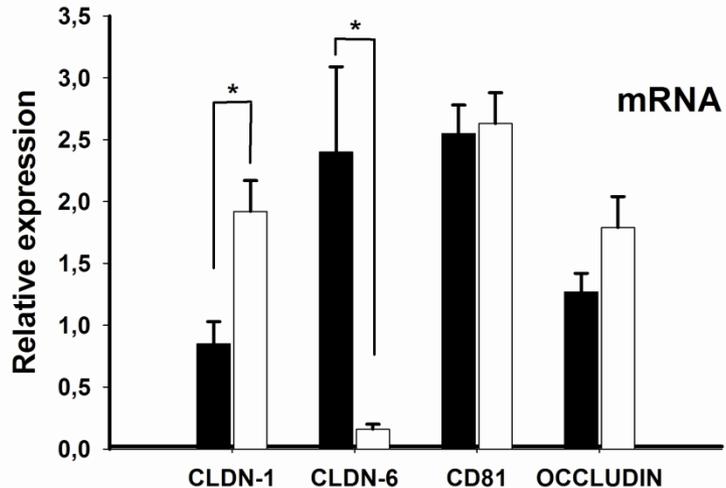


Normál máj



HCV rekurrencia

FIG1.



A CLDN-6 fehérje expresszálódik a májszövetben

A HCV rekurrencia idején a CLDN-1 és CLDN-6 expresszió magasabb, míg a CD81 expresszió alacsonyabb, mint egészséges májszövetben

Az occludin fehérje szintje nem változik

A CLDN-1 mRNS szintén magasabb rekurrencia esetén, míg a CLDN-6 mRNS alacsonyabb, míg a CD81 és occludin nem változik (microRNS-ek?)

HCV reinfekció transzplantált májban

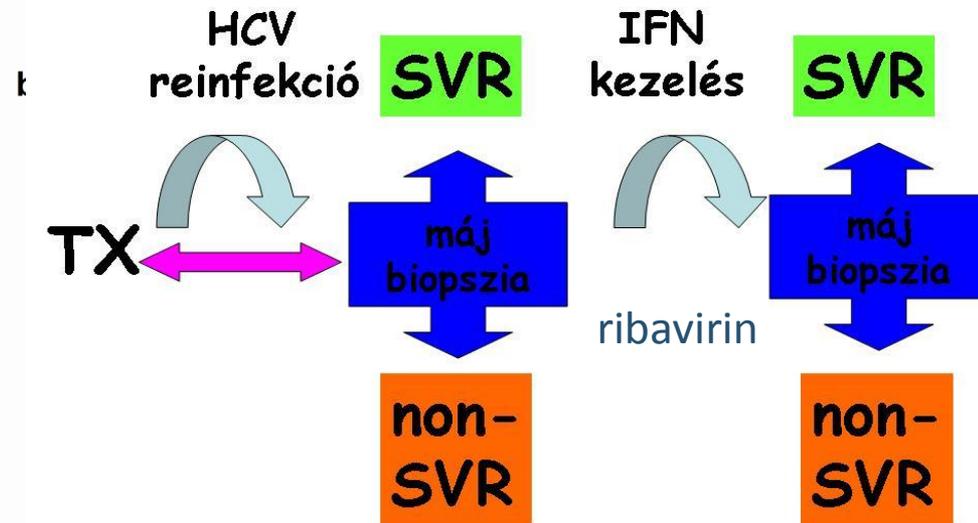
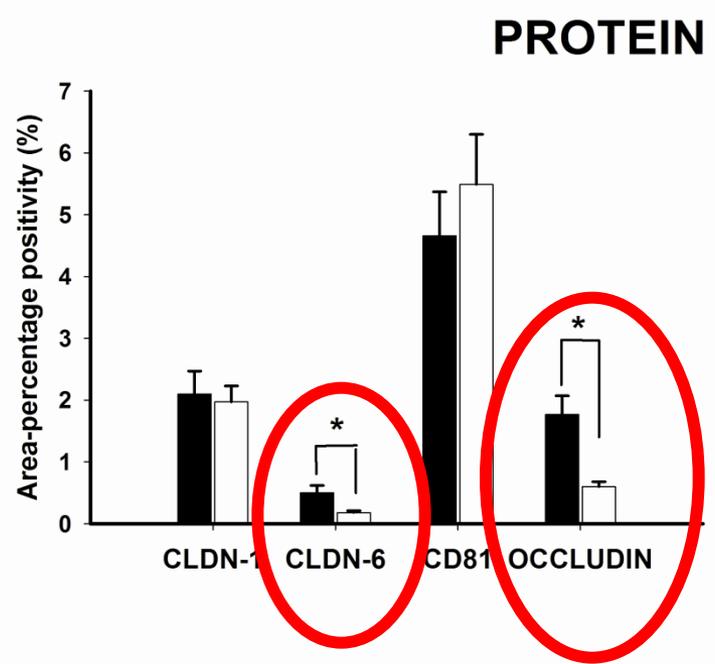
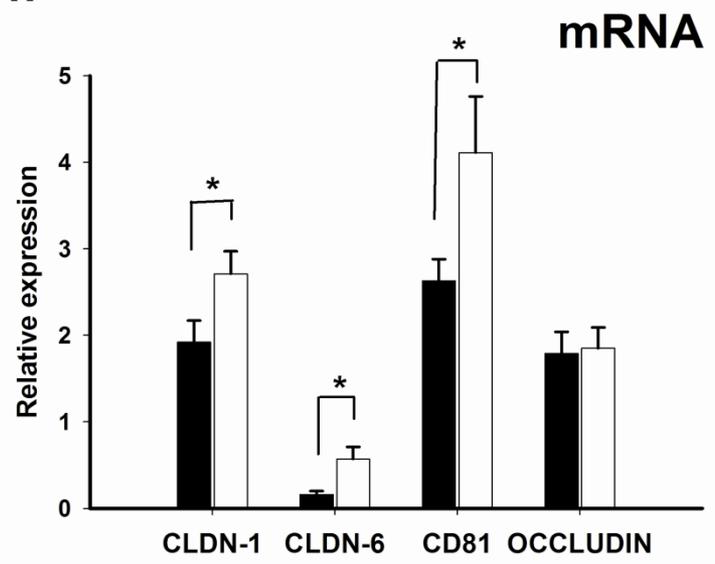


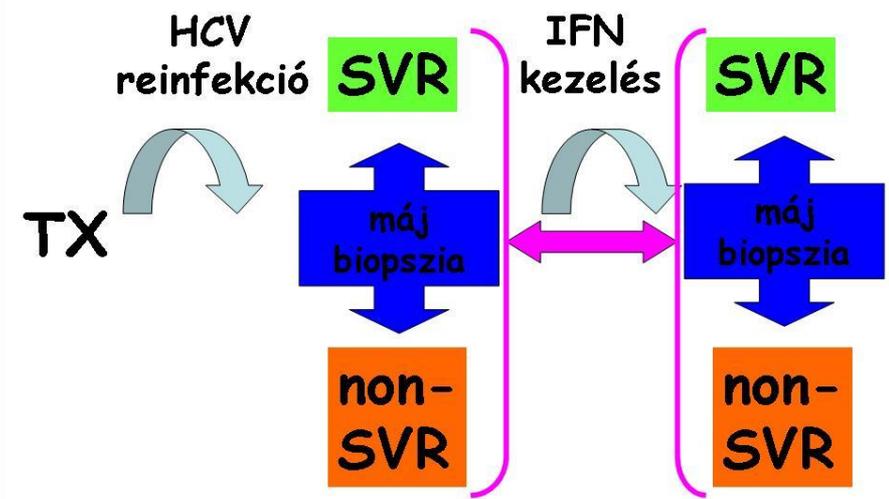
FIG4.



a.,



b.,



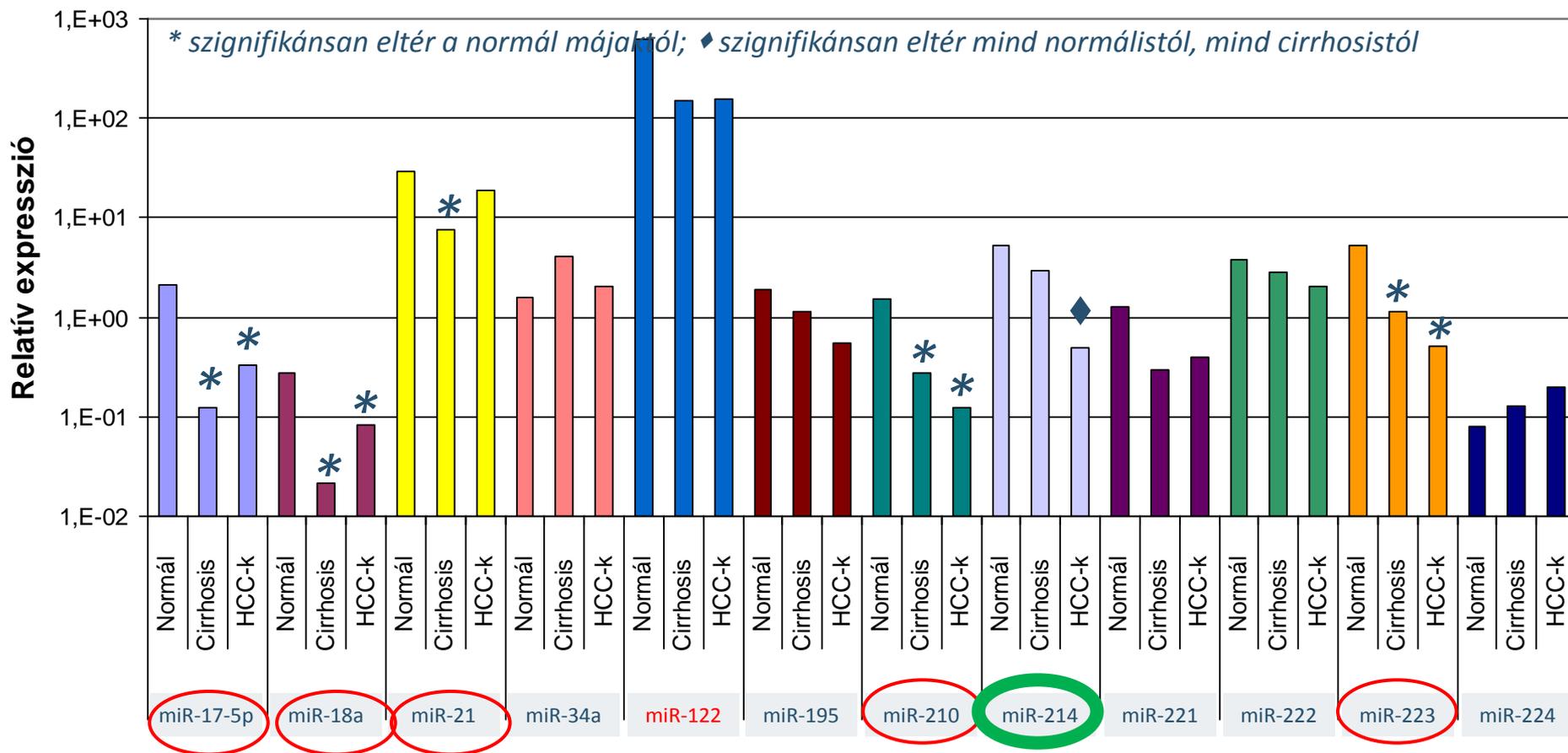
MicroRNS-k jelentősége a májbetegségekben

- Számos májbetegségben **jellegzetes** a miR mintázat
- **miR-122** az első máj-specifikus miRNS
 - Fokozza a HCV replikációt
 - Összefügg a koleszterin bioszintézissel
- MicroRNS-ek szerepe a **hepatocellularis carcinomában**
 - Egyes microRNS expresszió változása összefügg a **túléléssel**
 - microRNS mintázat összefügg a **prognózissal, kiújulással**
 - **anti-miR terápiás hatású is lehet**

Lendvai és mtsai 2010,

Bala et al W J Gastroent 15 2009, Bai et al J Biol Chem 284 2009,

mikroRNS expresszió HCC és cirrhotikus tumor körüli májban



3.1. Célkeresztben a szolid daganat

- Disszeminált daganat kezelése az eredeti daganat genotípusára alapozva?
- Az emlőrák kemoterápiás érzékenységének genomikai predikciója
- Molekuláris célpont-azonosítás májrákban
- **Molekuláris célpont-azonosítás melanómában :
Tímár József, Rásó Erzsébet, Hegedűs Balázs**
- **II.sz. Pathologiai Intézet**

Malignus melanoma molekuláris felosztása

- UV-indukált: BRAF mutáció (60%), N-RAS mutáció (15%), KIT mutáció (10%)
- Non-UV-indukált: c-KIT mutáció (30%)
- Örökletes: p16 mutáció CDKN2A (30%)

Melanóma terápia' 2011

- BRAF mutáns: BRAF-inhibitor
- BRAF vad: ???
- NRAS mutáns: ???
- KIT mutáns: KIT-inhibitor (Imatinib)
- Valamennyi forma(?): anti-CTL4 antitest, citokinek (IFN, IL-2): **szelektálatlan**

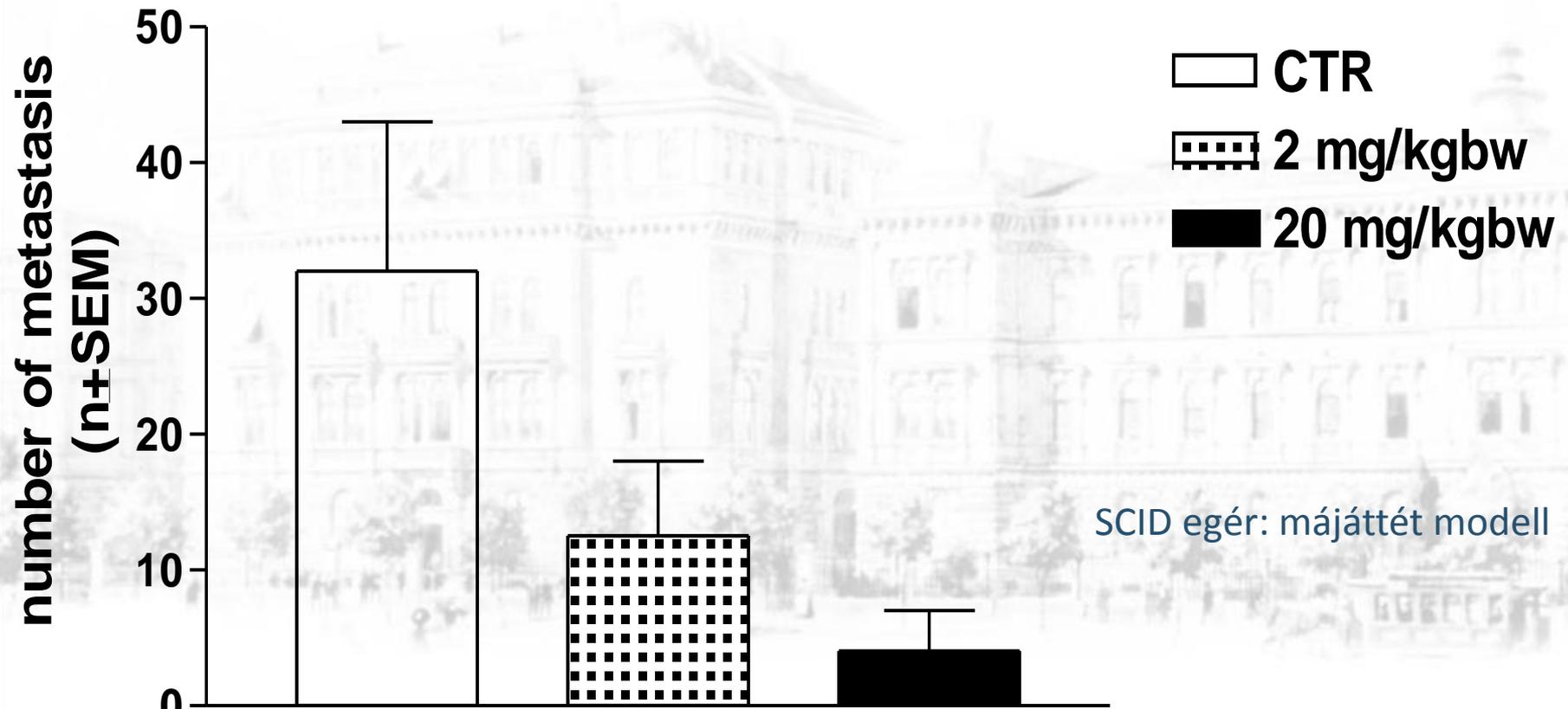
IFN-terápia molekuláris háttere

- Az UV-indukált melanómában azonosítható egy IFN-rezisztencia mintázat, melyben azonban az IFN-regulált gének kisebbségben vannak
- Másrésztől azonban azonosítható szintén egy metasztázis-asszociált mintázat, amelyben jelentős számban vannak IFN-regulált gének
- Ebből arra következtettünk, hogy a citokin-terápia iránti rezisztencia és az áttétképző képesség kialakulásának közös molekuláris alapjai vannak **(IFN-, motilitási- és sex hormon receptor jelpályák)**

Cell line	Deviation	Localization
A2058	Point mutation SNP	1666 (exon 12) 2955 (exon 25)
HT168	Point mutation Point mutation Point mutation	1417 (exon 10) 1666 (exon 12) 2570 (exon 21)
HT168M1	ECD del/truncation SNP	? (exon 1-12) 2607 (exon 21)
HT199	ECD del/truncation SNP	? (exon 1-12) 2955 (exon 25)
M35	SNP SNP	571 (exon 3) 2607 (exon 21)
WM35	Exon skipping Point mutation Alternative splice site SNP SNP	Exon 4 1417 (exon 10) exon 15(1993)/exon 17(2203) 2607 (exon 21) 3228 (exon 27)
WM983A	Exon skipping SNP SNP	Exon 4 2607 (exon 21) 3228 (exon 27)
WM983B	Point mutation SNP	1417 (exon 10) 2955 (exon 25)

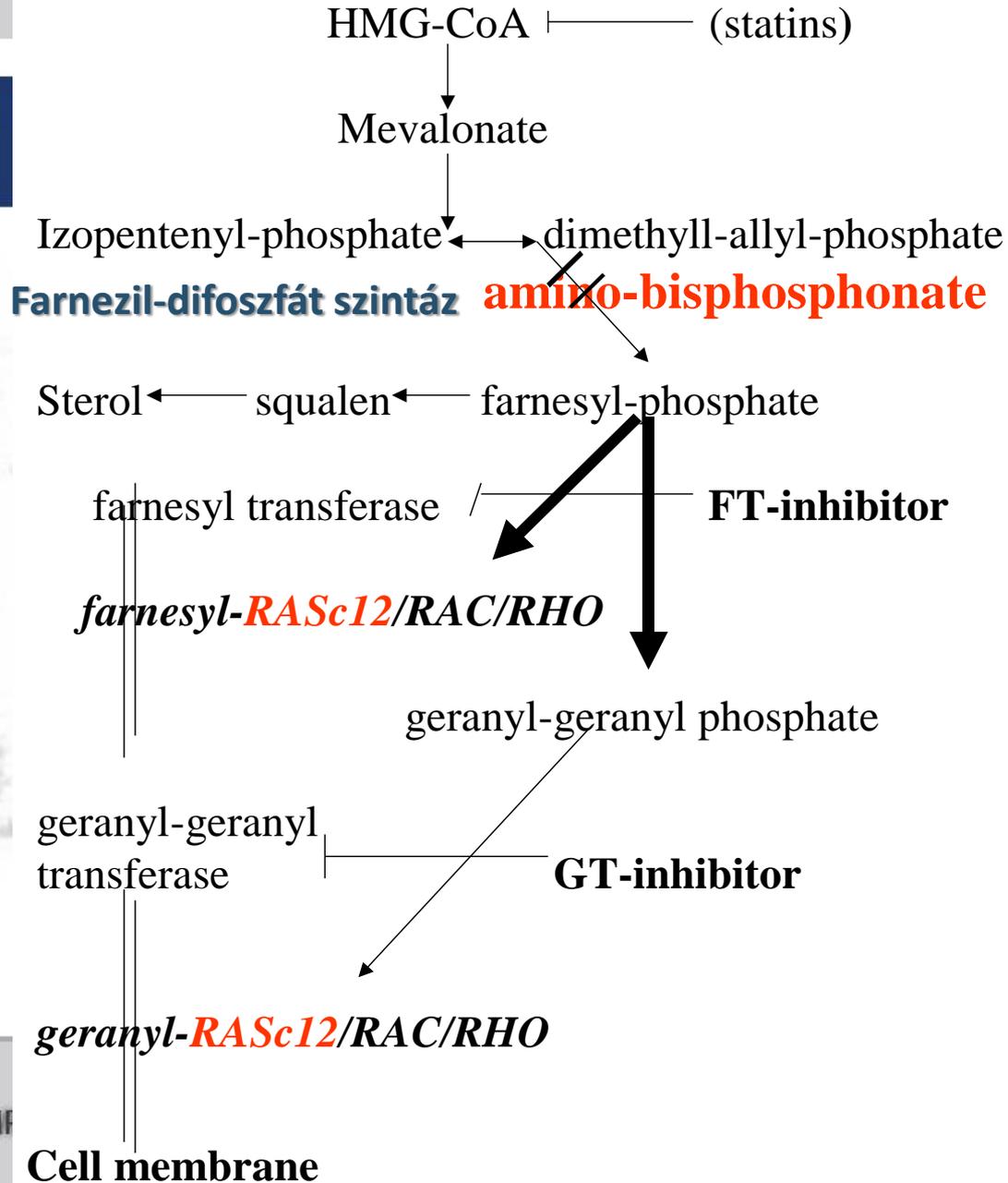
Valamennyi az extracelluláris domént érinti!!!!

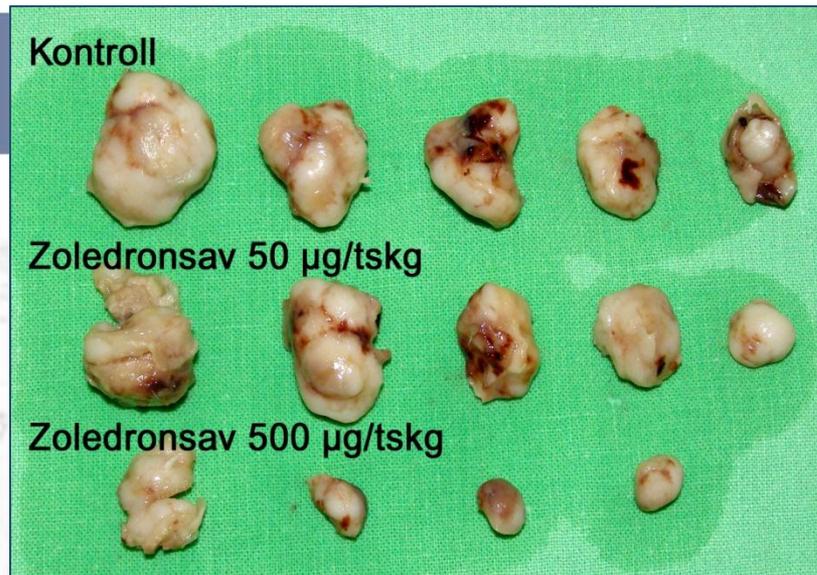
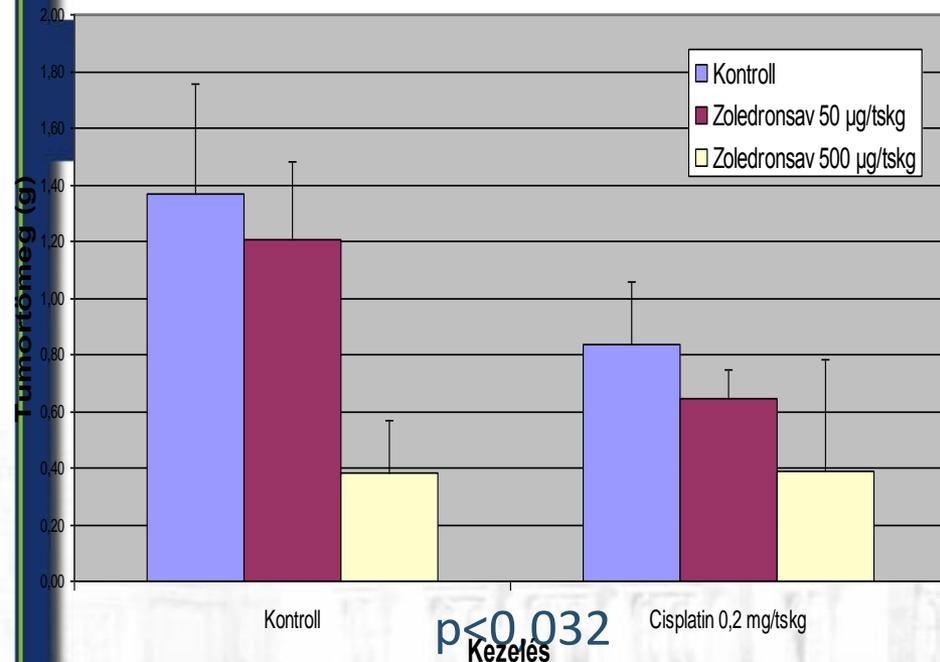
EGFR-gátló Iressa hatása emberi melanóma májattétképzésére



Preniláció-gátlás problematikája (melanómában)

- Farnezil-transzferáz gátlók sikertelennek bizonyultak klinikailag: szelektálatlan betegpopulációban
- OK: geranil-transzferáz re-aktiválódás
- Kérdés: nem-szelektív preniláció-gátlóknak lehet-e anti-tumorális hatása?





SCID eger xenograft

- KRAS mutáns emberi tüdőrák sejtvonalak preniláció-gátló rezisztensek
- KRAS mutáns emberi vastagbélrák sejtvonalak preniláció-gátló rezisztensek
- NRAS vagy BRAF mutáns emberi melanoma sejtvonalak preniláció-gátló rezisztensek
- **Jelenleg a BRAF/NRAS vad melanómákban nincsen molekuláris terápia**

Matolcsy András, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

- **A B-sejtes lymphomák progressziójának genetikai jellegzetességei**
- Mi-RNS jellemzők a lymphoma-transzformációban
- Mikrokörnyezet (gazdaszervezet) jelentősége a lymphoma transzformációban
- A CML progressziójának genetikai változói

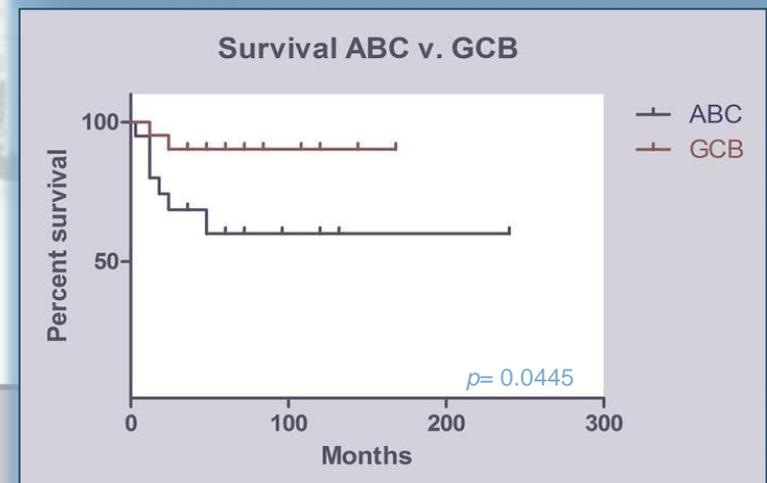
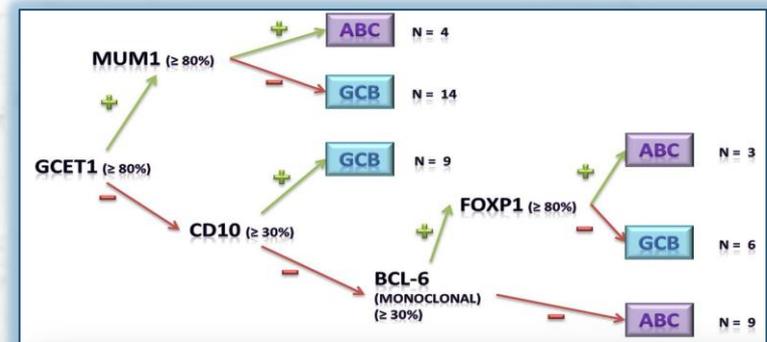
az extranodalis lymphomák kevesebb, mint 5%-át teszi ki. A germinatív centrum (GCB) és az aktivált B sejt (ABC) eredet a nodalis lymphomák esetében eltérő prognózist mutat, míg PBL esetében az eddigi vizsgálatok nem találtak összefüggést a túléléssel.

I. A sejteredet meghatározása és összefüggése a túléléssel

- A sejteredet meghatározási algoritmus alapján a 45 PBDLBCL-es eset közül 21 ABC és 24 GCB eredetűnek bizonyult.
- Az ABC eredetű csoportban a kezelés 13 betegnél eredményezett komplett remissziót (62%) és 6 beteg halt meg 1 éven belül, míg a GCB csoportban 19 beteg (83%) került komplett remisszióba és 3 beteg halt meg.
- A Kaplan-Meier analízis alapján a két csoport túlélése szignifikánsan különbözött ($p=0,04$).

Következtetések .

Vizsgálatunk során igazoltuk, hogy a PBDLBCL esetében, a nodális DLBCL-hez hasonlóan, GCB sejteredet esetén kedvezőbb a túlélés.



3.2. Célkeresztben a haematopoetikus rendszer daganatai (Matolcsy András)

- A B-sejtes lymphomák progressziójának genetikai jellegzetességei
- Mi-RNS jellemzők a lymphoma-transzformációban
- **Mikrokörnyezet (gazdaszervezet) jelentősége a lymphoma transzformációban**
- A CML progressziójának genetikai változói

II. A mikrokörnyezet vizsgálata az ABC és GCB eredetű csoportokban

A GCB csoportban a tumoros mikrokörnyezet szignifikánsan több CD3 + lymphocytát tartalmazott ($p=0,04$) és a CD4/CD8 arány is szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ABC csoporthoz képest ($p=0,02$).

III. A CD3 T-lymphocytá infiltráció hatása a túlélésre

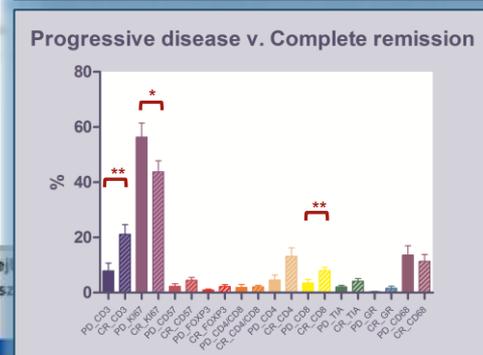
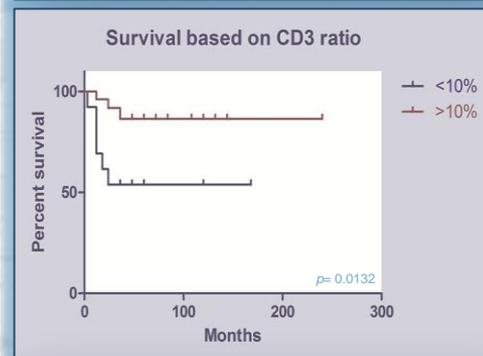
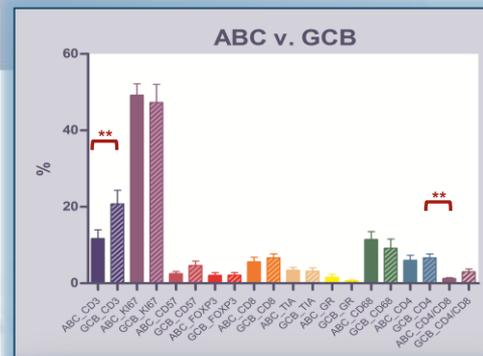
A CD3 T-lymphocyták túlélésre gyakorolt hatása szempontjából Kaplan-Meier analízist végeztünk, 10%-os cut-off érték meghatározása után. Az analízis alapján a két csoport túlélése szignifikánsan különbözött ($p=0,01$).

IV. A mikrokörnyezet összehasonlítása komplett remissziót mutató és progrediáló esetekben

Magasabb proliferációs rátát találtunk a progrediáló esetekben ($p=0,077$). A komplett remisszióba került esetekben szignifikánsan több CD3+ T-sejtet ($p=0,039$), illetve szignifikánsan több CD8+ cytotoxikus T-sejtet észleltünk.

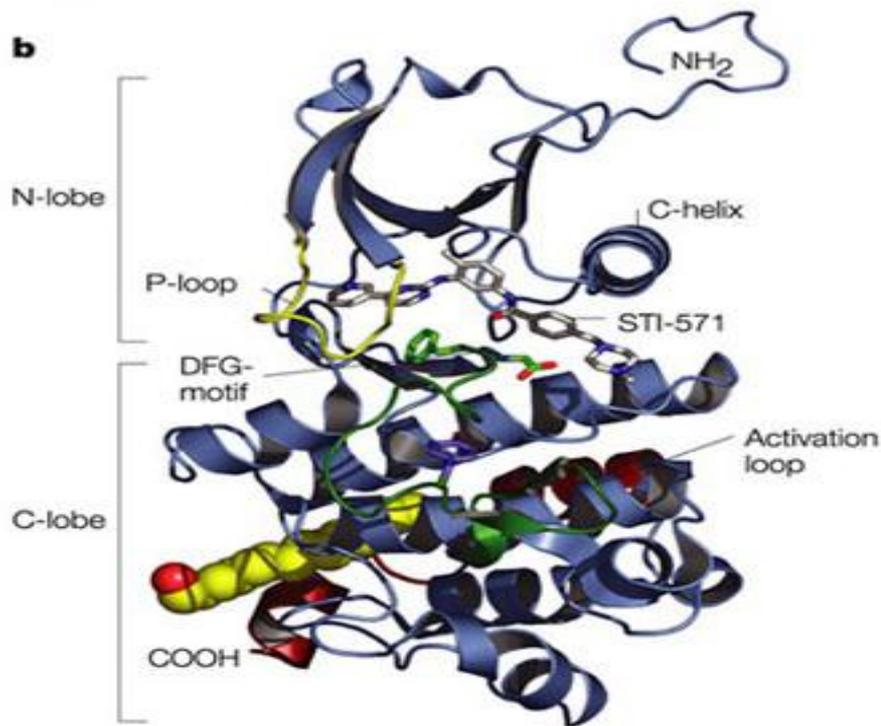
Következtetések

- A GCB sejteredetű PBDLBCL mikrokörnyezetében magasabb CD3+ T-sejt arányt észleltünk, amely az adaptív immunválasz magasabb aktiváltsági szintjét jelezheti.
- A CD3+ T-lymphocyták százalékos aránya a teljes betegpopulációban összefüggést mutat a túléléssel.
- A komplett remissziót mutató és a progrediáló esetek mikrokörnyezetének összehasonlítása során a komplett remissziót elérő esetekben talált kifejezettebb CD3+ T-sejtes és CD8+ T-sejtes infiltráció antitumorális hatása magyarázhatja ezen esetek alacsonyabb proliferációs aktivitását, és kedvezőbb terápiás válaszát.

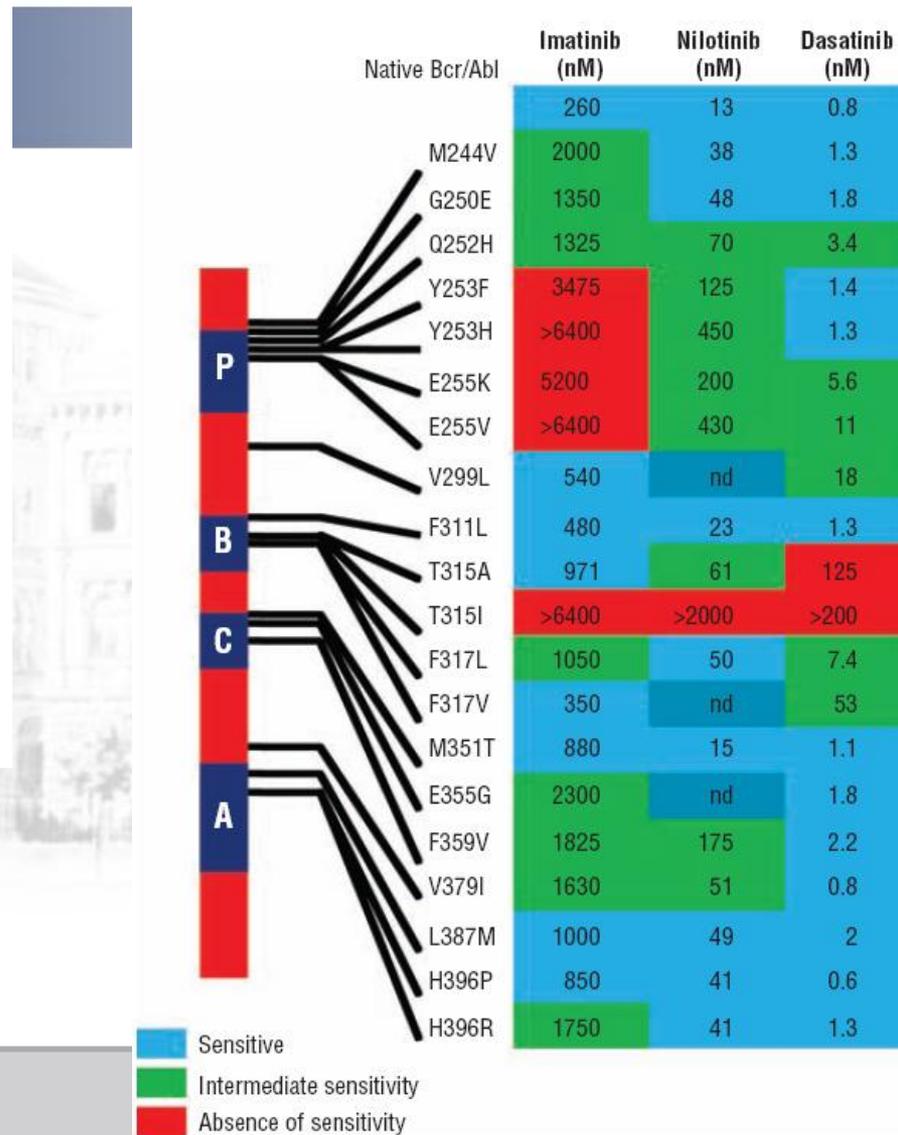


3.2. Célkeresztben a haematopoetikus rendszer daganatai (Matolcsy András)

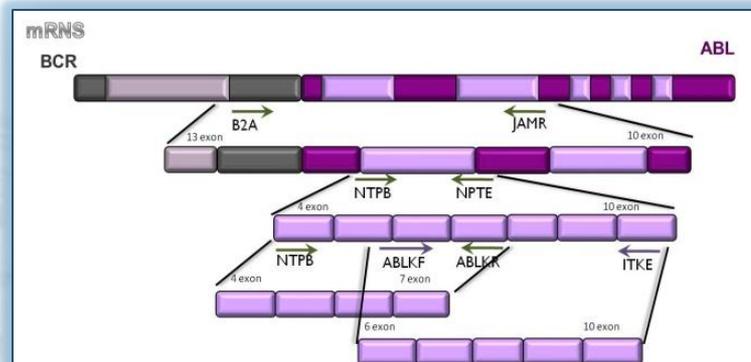
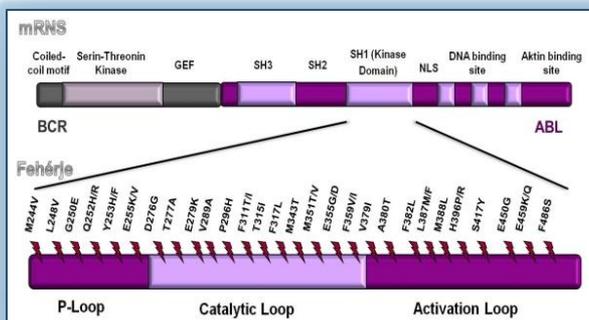
- A B-sejtes lymphomák progressziójának genetikai jellegzetességei
- Mi-RNS jellemzők a lymphoma-transzformációban
- Mikrokörnyezet (gazdaszervezet) jelentősége a lymphoma transzformációban
- **A CML progressziójának genetikai változói**



Mutáció	Dasatinib	Nilotinib
E255K/V	Red	Red
V299L	Red	Green
T315I	Red	Red
F317L/I	Red	Green
F359V/L	Green	Red

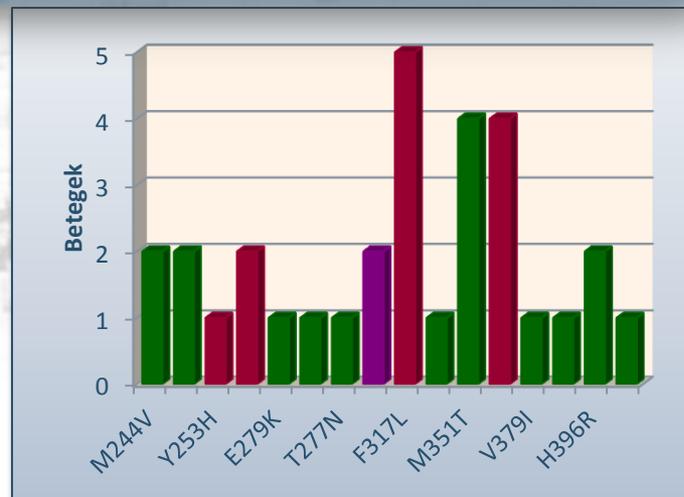


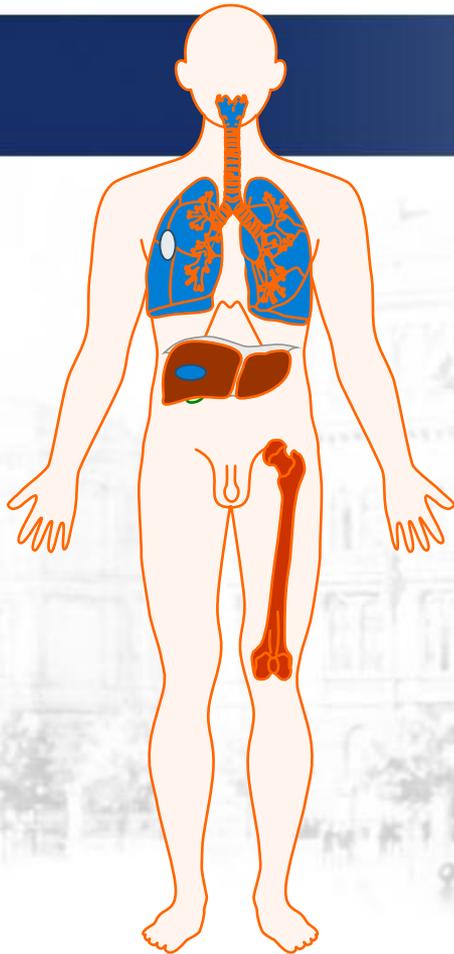
CLL genetikai progressziójának monitorozása



Eredmények

- Közel 160 rezisztens beteg vizsgálata, melynek során 31 betegben mutattunk ki mutációt.
- A rezisztencia mutációk 14 beteg esetében meghatározták a II. generációs tirozin kináz inhibitor (TKI) terápiát (nilotinib versus dasatinib).
- 2 esetben teljes TKI rezisztenciát mutató T315I mutáció.
- 13 esetben abl gén 7 exon deléciója, amelynek rezisztenciát okozó hatása a jelen adatok alapján kérdéses.
- 2 esetben 8 és 9 exon között 35 bázis inzercióját.



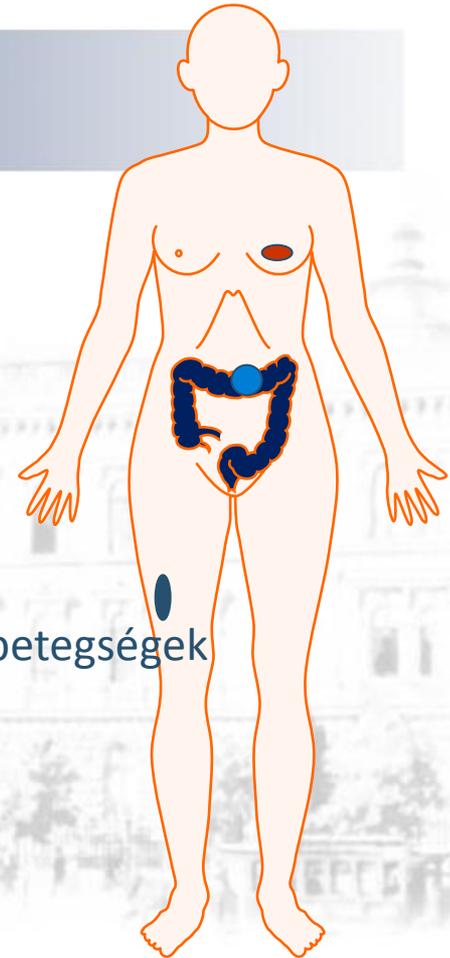


Daganatok

- Tüdőrák
- Emlőrák
- Vese-rák
- Vastagbél-rák
- Máj-rák
- Melanoma
- CML
- B-NHL

Daganatos beteg egyéb betegségei

- Metabolikus szindróma
- Vesebetegség
- Agyi neurodegeneratív betegségek (Parkinson, Alzheimer)
- Bakteriális szepszis

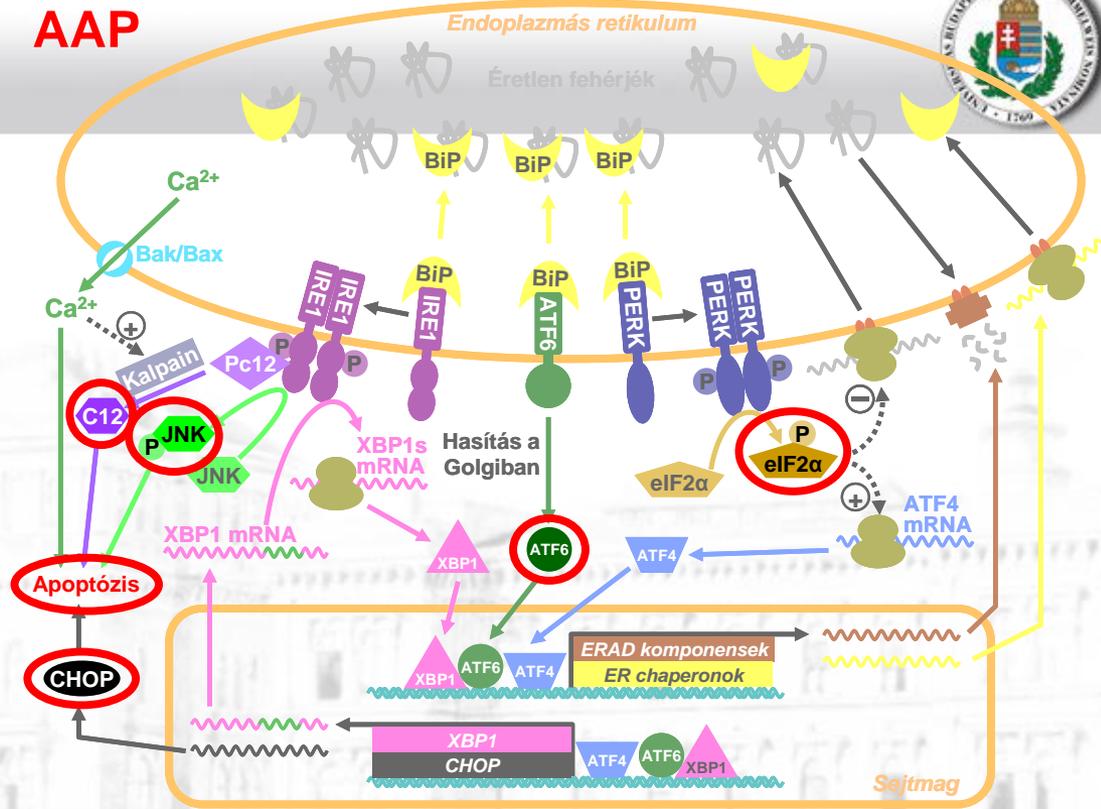
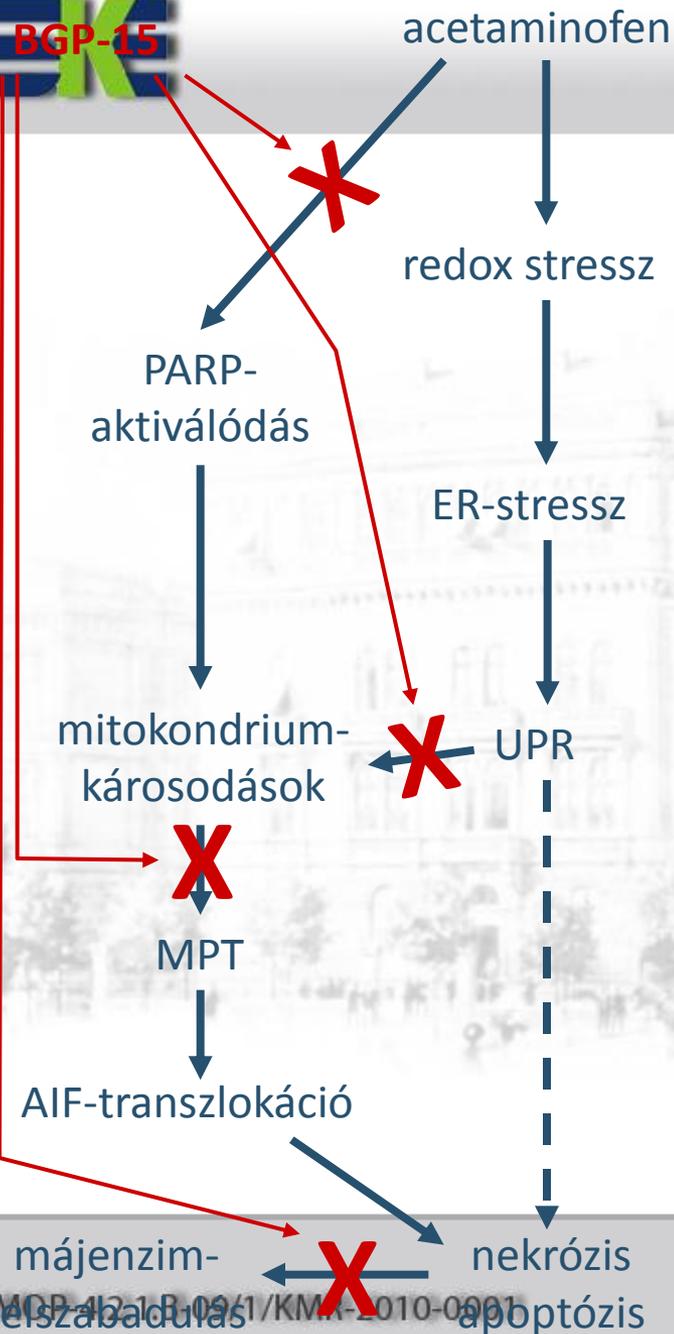


3.3. Célkeresztben a daganatos beteg

- **G-protein kapcsolt receptorok aktivációs modelljeinek elemzése**
- **Hunyadi László, Élettani Intézet**
- Az ER lumen redox homeostasisa a metabolikus szindróma terápia új célpontja
- Az agyi mitochondriális funkciók javítása a complex 1, a-KGDH és a PINK1 működések modulálása révén
- Mikropartikulum kifejlesztése a szepszis kezelésére (Ligeti Erzsébet)

3.3. Célkeresztben a daganatos beteg

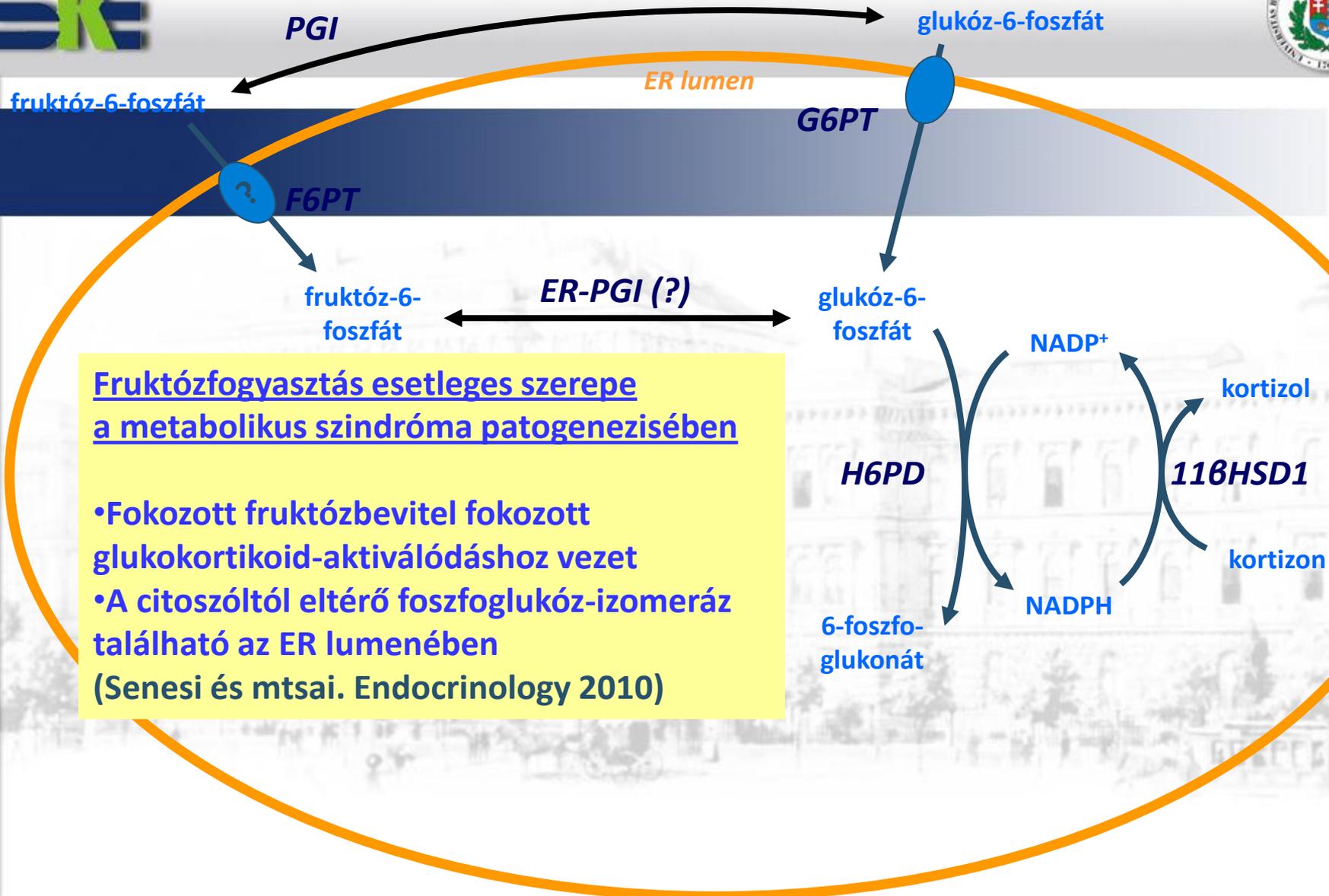
- **Az ER lumen redox homeostasisa a metabolikus szindróma terápia új célpontja**
- **Mandl József, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet**
- Az agyi mitochondriális funkciók javítása a complex 1, a-KGDH és a PINK1 működések modulálása révén
- Mikropartikulum kifejlesztése a szepszis kezelésére



AAP ER stresszt és apoptózist okoz
Az inzulin szenzitizáló BGP-15 (NGene)
a sublethalis dózisban adott AAP hatását
jelentősen mérsékli/védi in vivo
(Nagy és mtsai. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2010)

Alacsony betegszámú klinikai fázis II
vizsgálatok:
(Literáti Nagy és mtsai. Brain Res. Bull. 2010)

- Kiterjedt vizsgálatokat folytattunk a BGP-15 inzulinérzékenyítő, HSP-indukáló molekula terápiás hatásainak tisztázására
- Kimutattuk, hogy a BGP-15 képes jelentősen mérsékelni egy antipszichotikum, az olanzapin 2-es típusú cukorbetegséget előidéző mellékhatását.



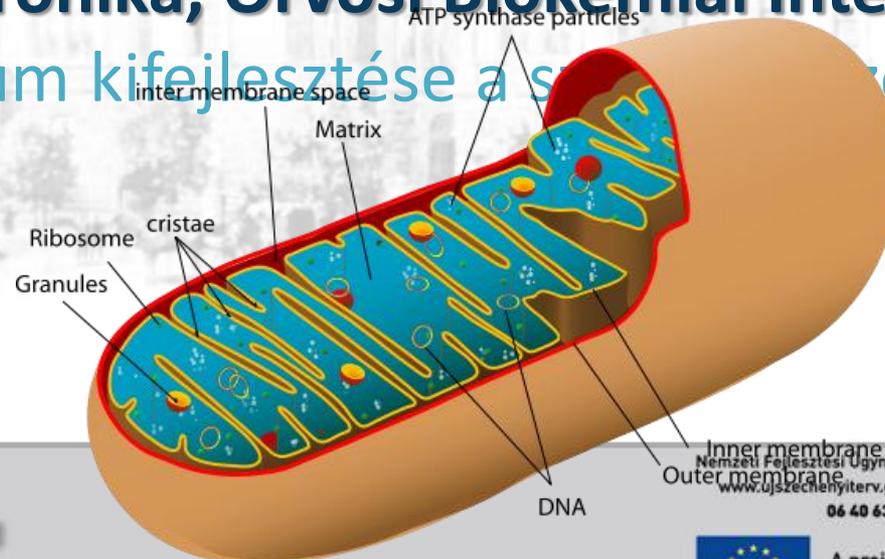
Fruktózfogyasztás esetleges szerepe a metabolikus szindróma patogenezisében

- Fokozott fruktózbevitel fokozott glukokortikoid-aktiválódáshoz vezet
- A citoszóltól eltérő foszfoglukóz-izomeráz található az ER lumenében (Senesi és mtsai. Endocrinology 2010)

- Különböző patkány és humán szövetek vizsgálatával bizonyítottuk a tápanyag-szenzor funkcióban kulcsfontosságú **hexóz-foszfát-dehidrogenáz** „housekeeping” jellegét. Ezen eredményeink felvethetik a metabolikus szindróma befolyásolásának új lehetőségét.

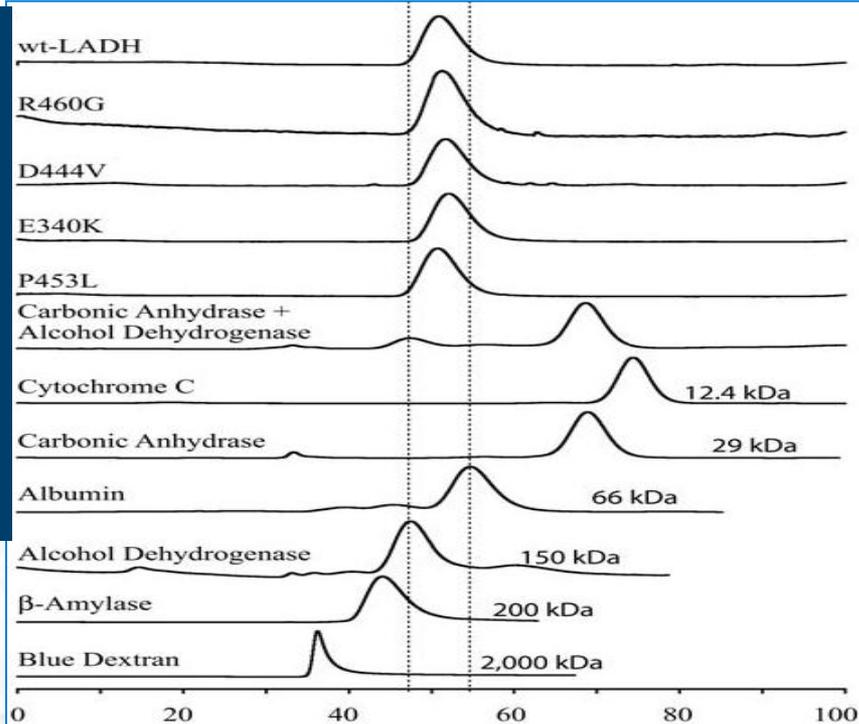
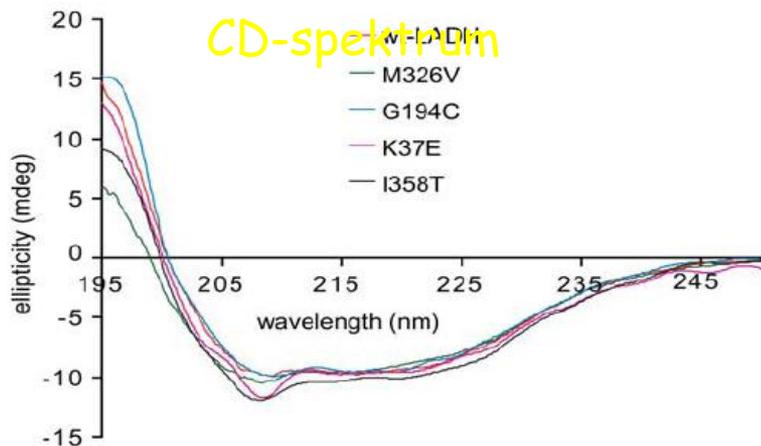
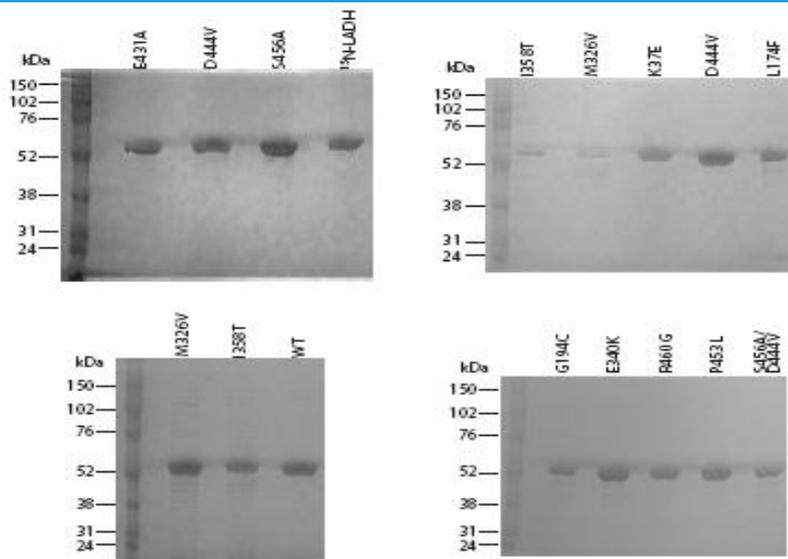
3.3. Célkeresztben a daganatos beteg

- Az ER lumen redox homeostasisa a metabolikus szindróma terápia új célpontja
- **Az agyi mitochondriális funkciók javítása a complex 1, a-KGDH és a PINK1 működések modulálása révén:
Ádám-Vizy Veronika, Orvosi Biokémiai Intézet**
- Mikropartikulum kifejtése a s...



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszachenyi.terv.gov.hu
06 40 638 638

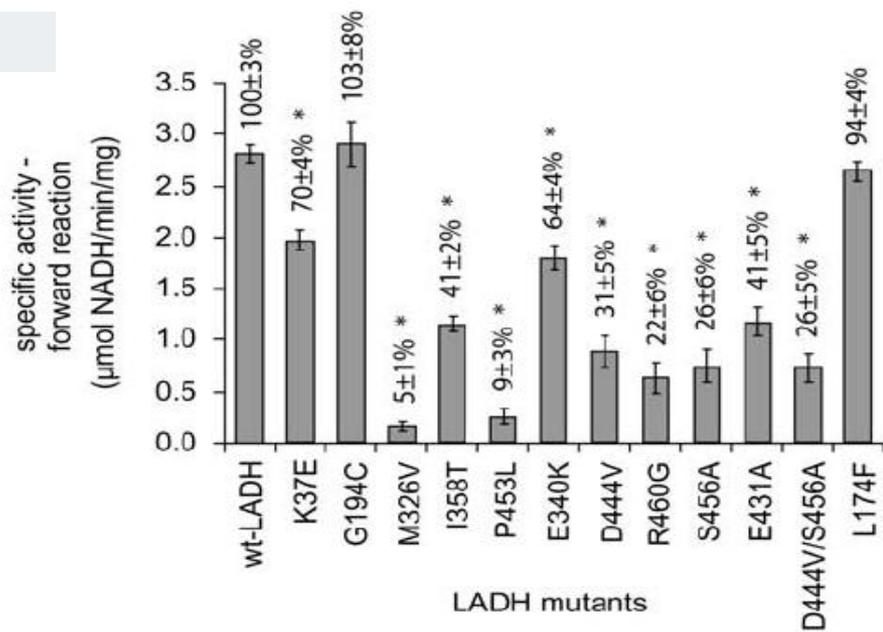




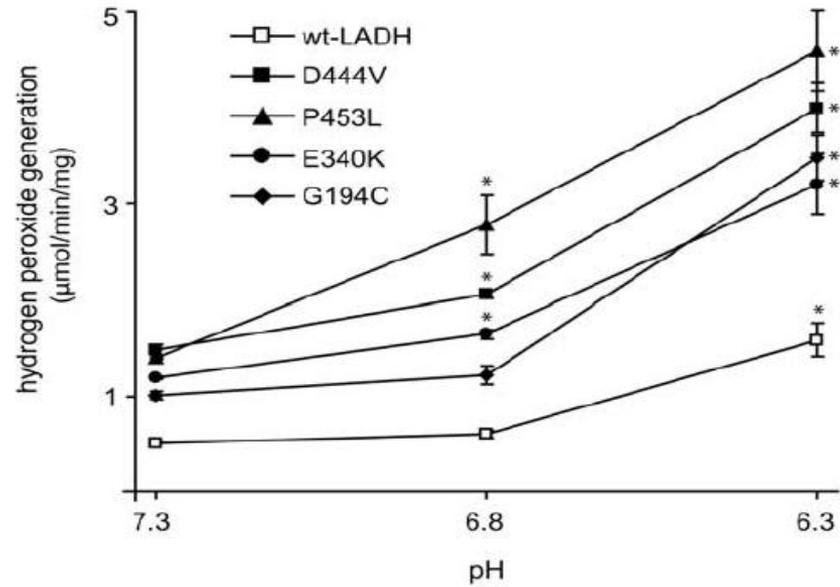
FAD-kötés erősségének változása:

P453L: 0.66 ± 0.047
G194C: 0.72 ± 0.011
E340K: 0.99 ± 0.027
D444V: 0.95 ± 0.024
K37E: 0.67 ± 0.048

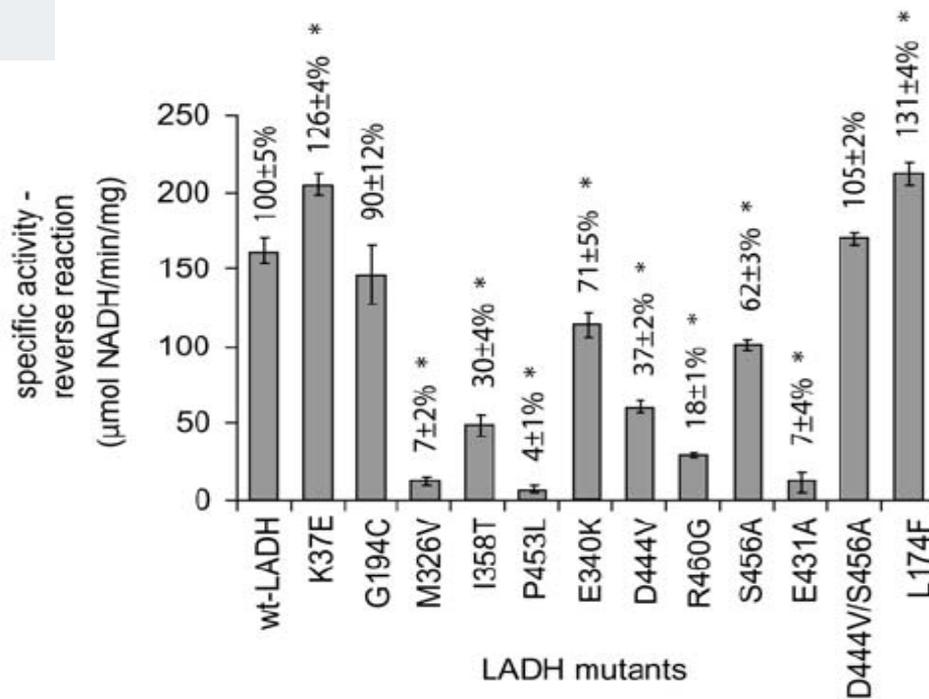
(WT-LADH:
 1.01 ± 0.017)



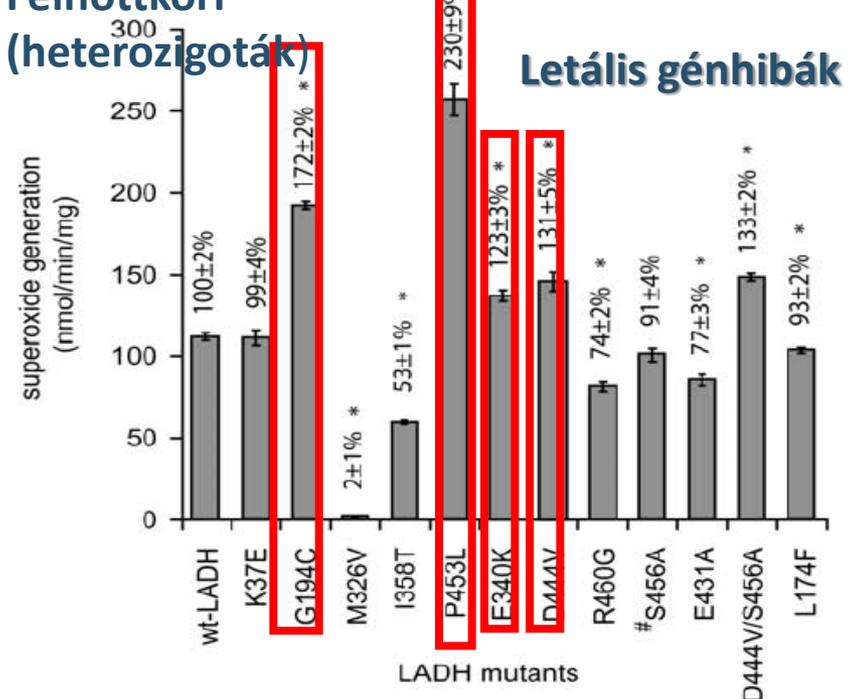
Mutációk hatása a ROS termelő képességre



Mutációk hatása a NADH-képző képességre



Felnőttkori (heterozigoták)



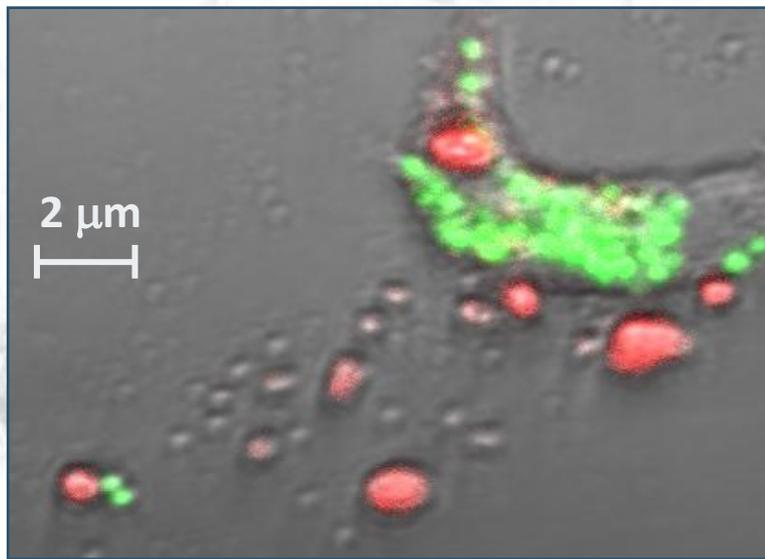
Letális génhibák

- Vizsgálataink kimutatták, hogy a ciklofilinD hátráltatja a neuronsejtek ischemiás károsodását in vitro körülmények között
- A védőhatásban a mitochondriális complex-I fontos tényező
- In vivo a ciklofilinD hiányos állatok rezisztensek fokális agyi ischemiára

3.3. Célkeresztben a daganatos beteg

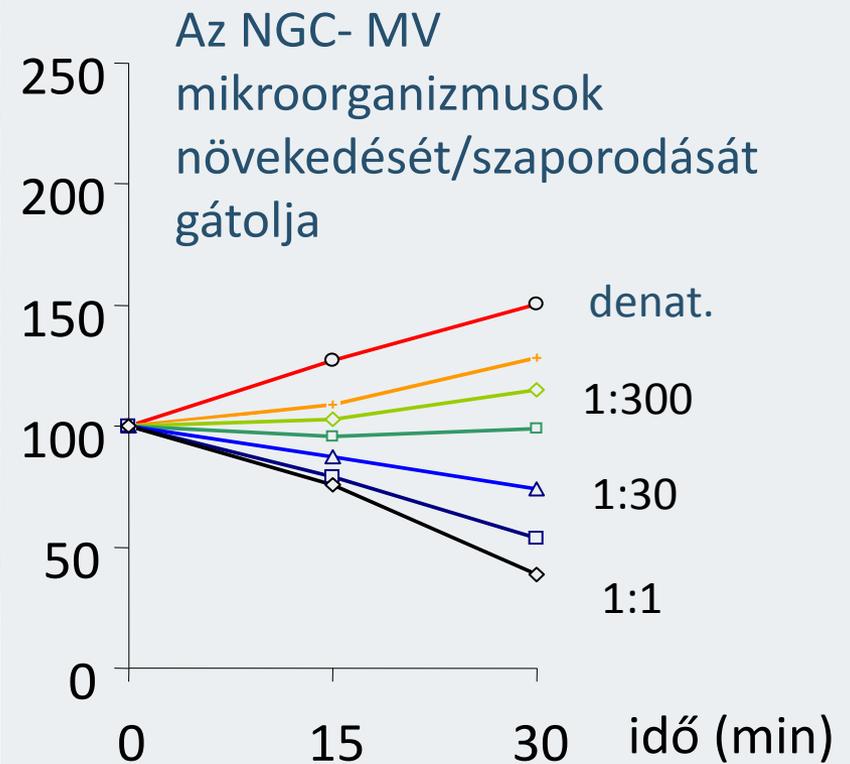
- Az ER lumen redox homeostasisa a metabolikus szindróma terápia új célpontja
- Az agyi mitochondriális funkciók javítása a complex 1, a-KGDH és a PINK1 működések modulálása révén
- **Mikropartikulum kifejlesztése a szepszis kezelésére Ligeti Erzsébet, Élettani Intézet**

Neutrofil granulocitákból sejtmentes vezikula populáció keletkezik



Vezikula, GFP-baktérium

Baktérium túlélés (CFU %)



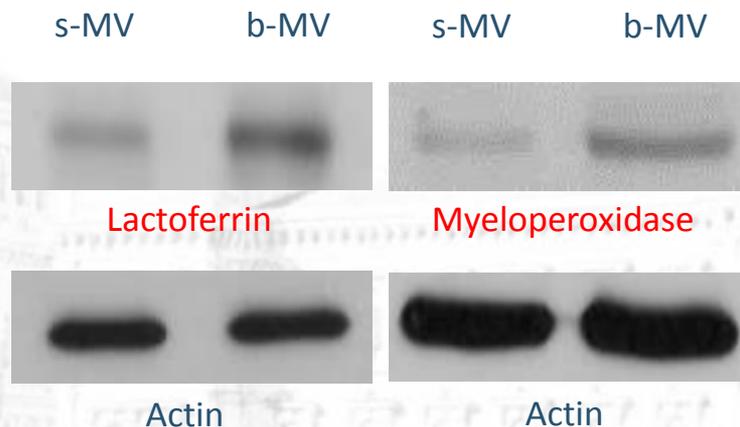
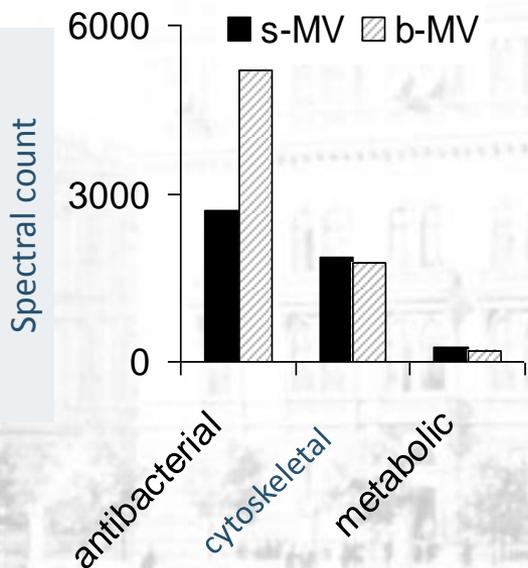
Az antibakteriális hatás vizsgálata

Proteomikai elmezés

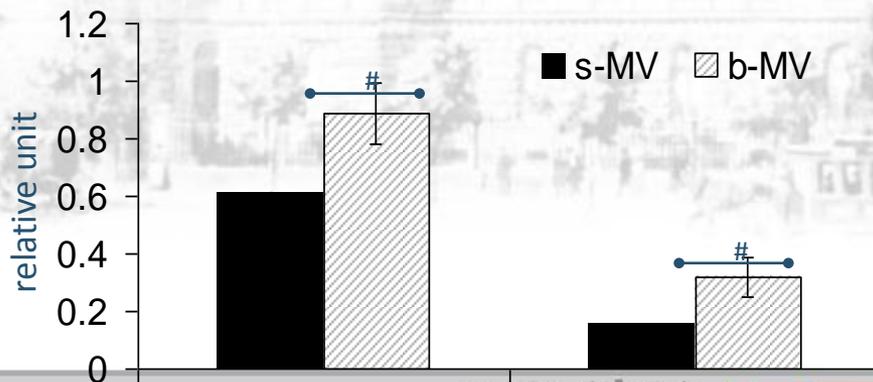
- 282 fehérje azonosítása 95%-os konfidencia szinten
- **29 antibakteriális fehérje dúsul b-MV-ben**
- NADPH oxidáz nincsenek jelen (nem-oxidatív antibakteriális hatás)
- proteomikai eredmények alátámasztása immunoblott analízissel

A (proteomikai elemzés)

B (immunoblot)

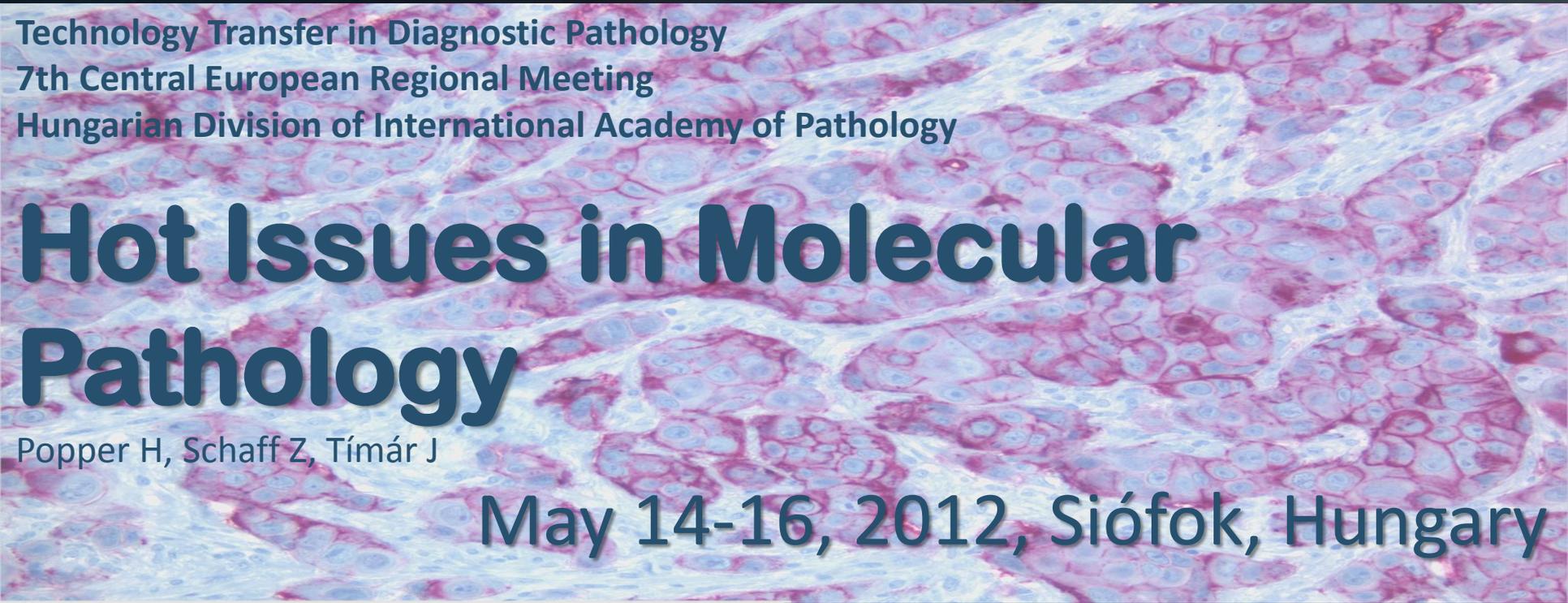


C (denzitometria)



Project Indikátorok

	mutató	egység	kiindulás	célérték	PEJ4
1	Nemzetközi publikációk	db	0	29	55
2	Előadások nemzetközi konferenciákon	db	0	29	39
3	szabadalom	db	0	4	1
4	Szakmai ajánlások	db	0	3	2
5	Új K+F projektek	db	0	18	7
5	Fokozattal rendelkező kutatók (teljes munkaidőben)	fő	11	15	13
6	Fokozattal rendelkező kutatók (foglalkoztatottak)	fő	10	16	23
7	Új PhD hallgatók száma	db	0	16	13



Technology Transfer in Diagnostic Pathology
7th Central European Regional Meeting
Hungarian Division of International Academy of Pathology

Hot Issues in Molecular Pathology

Popper H, Schaff Z, Tímár J

May 14-16, 2012, Siófok, Hungary

