

MTA Doktori Értekezés

**Molekuláris mechanizmusok a
hormonrendszer daganataiban**

**Dr. Patócs Attila
Semmelweis Egyetem
Laboratóriumi Medicina Intézet**



Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

	Rövidítések jegyzéke	4.
I.	BEVEZETÉS	7..
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	14.
II.1.	Örökletes endokrin tumorszindrómák	14.
II.1.1.	Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es típus	14.
II.1.1.1.	Definíció, klinikai megjelenés	14.
II.1.1.2.	MEN1 szindrómáért felelős gén és a társult patomechanizmus	17.
II.1.2	Multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa (MEN2)	20.
II.1.2.1.	Definíció, klinikai megjelenés	20.
II.1.2.2.	A MEN 2 szindróma genetikai háttere - RET protoonkogén	22.
II.1.3.	Von Hippel-Lindau szindróma	27.
II.1.3.1.	Definíció, klinikai megjelenés	27.
II.1.3.2	VHL génmutációkhoz társuló pathomechanizmus	28.
II.1.4.	Neurofibromatózis 1-es típusa	30.
II.1.5.	Örökletes phaeochromocytóma/paraganglioma szindrómák	31.
II.1.6.	Csírasejtes PTEN mutációkhoz társuló kórképek	32.
II.1.6.1.	Cowden kór	32.
II.1.6.2.	Genotípus-fenotípus összefüggések PTEN csírasejtes mutációkhoz társuló kórképekben	34.
II.2.	Sporadikus endokrin daganatok	35.
II.2.1.	Mellékvesekéreg-karcinóma	35.
II.2.1.1.	Definíció, gyakoriság	35.
II.2.1.2.	Molekuláris mechanizmusok ACC-ben	36.
II.2.2.	Klinikai hormontútermeléssel nem járó, jóindulatú mellékvesekéreg daganatok	39.
II.3.	Glükokortikoid receptor (GR)	39.
II.3.1.	A GR genetikai variánsai és klinikai jelentőségük	39.
II.3.1.1.	GR génmutációk	40.
II.3.1.2.	GR polimorfizmusok	42.
II.3.2.	A GR izoformák és klinikai jelentőségük	42.
II.3.3.	Egyéb, ritkább GR izoformák	45.
II.3.4.	A GR poszttranszlációs módosulása	46.
II.3.5.	A GR jelátviteli út	47.
II.3.5.1.	A GR genomiális hatásai	47.
II.3.5.2.	A GR nem genomiális hatásai	48.
II.3.6.	A glükokortikoidok gyulladásgátló hatása és a glükokortikoid-rezisztencia kialakulásának mechanizmusai IBD-ben	48.
II.3.7.	A glükokortikoidok szerepe a cirkadián óra szabályozásában	51.
II.3.8.	A cirkadián óra molekuláris mechanizmusa	52.
II.3.9.	A cirkadián óra klinikai jelentősége	53.
II.4.	Sporadikus hipofízis daganatok	54.
II.4.1	Definíció, gyakoriság	54.
II.4.2.	Genetikai és epigenetikai eltérések hipofízis daganatokban	55.
II.4.3.	Jelátviteli utak eltérései hipofízis adenomákban	58.
II.5.	Sejtciklus	60.
II.5.1.	A sejtciklus szabályozása	62.
II.5.2.	A sejtciklus szabályozásában résztvevő molekulák prognosztikai jelentősége humán daganatokban	63.
II.5.3.	A sejtciklusdependens transzkripció vizsgálata	65.
II.5.4.	A sejtciklusdependens transzkripció program és szabályozása	67.
II.6.	Mikro-RNS-ek	69.
II.6.1.	A mikro-RNS-ek jellemzői és biogenezise	69.
II.6.2.	A mikro-RNS -ek szerepe hipofízis adenomákban	70.
II.6.3.	Mikro-RNS-ek szerepe a sejtciklus szabályozásában	71.
III.	CÉLKITŰZÉSEK	73.
IV.	BETEGEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	75.
IV.1.	Betegek és egészséges egyének	75.
IV.1.1.	Örökletes endokrin tumorszindrómákban szenvedő betegek	75.
IV.1.2.	Sporadikus, jóindulatú mellékvesekéreg adenómával diagnosztizált betegek	77.
IV.1.3.	Hormonvizsgálatok	77.

IV.2.	Daganatszövetek	78.
IV.2.1.	Hipofízis daganatok	78.
IV.2.2.	Mellékvesekéreggrák szövetmintái	80.
IV.2.3.	Mellékpajzsmirigy daganatok	80.
IV.3.	Molekuláris genetikai módszerek	81.
IV.3.1.	Örökletes genetikai eltérések vizsgálatához alkalmazott módszerek	81
IV.3.2.	A <i>C4B</i> és a <i>CYP21A2</i> gének kópiaszám és a <i>CYP21A2</i> gén szekvenálása	83.
IV.3.3.	A glükokortikoid receptor (<i>GR</i>) génvariánsok vizsgálata	85.
IV.3.4.	A <i>GR</i> expresszió vizsgálata	86.
IV.3.5.	A génexpresszió circadián változásának vizsgálata H295R mellékvesekéreg sejtvonalon	86.
IV.3.6.	Glükokortikoid receptor béta izoformát (<i>GRβ</i>) expresszáló sejtvonallétrehozása	86.
IV.3.7.	A sejtciklus dependens gén és mikroRNS expresszió vizsgálatban használt sejttenyészetek	87.
IV.3.8.	Nagyátersztőképességű mRNS és miRNS expressziós mérések	87.
IV.3.9.	Egyedi génexpressziós mérések validálása kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)	88.
IV.3.10.	Egyedi mikro-RNS expresszió mérés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)	89.
IV.4.	Áramlási citométerrel végzett mérések	91.
IV.4.1.	Apoptózis, sejtciklus-disztribúciós és sejtproliferációs vizsgálatok	91.
IV.4.2.	Sejtciklus szerinti sejtválogatás fluoreszcencia alapján áramlási citométerrel	91.
IV.5.	GRβ expresszáló sejtek szteroid érzékenységeinek vizsgálata	92.
IV.6.	A WEE1 3'UTR feltételezett mikro-RNS kötőhelyének vizsgálata	92.
IV.7.	Fehérje expresszió mérések Western blottal	93.
IV.7.1.	Mikro-RNS prekursorok transzfekcióját követő WEE1 fehérje expresszió mérése	93.
IV.7.2.	Az áramlási citométerrel szortolt sejtek foszfo-CDC-2 és RRM2 tartalma	93.
IV.8.	Hormonmeghatározások az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából	93.
IV.9.	Sporadikus hipofízis, sporadikus mellékvesekéreg, MEN1-hez társult valamint sporadikus mellékpajzsmirigy daganatokon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok	94.
IV.9.1.	Hipofízis szövetekben a WEE1 fehérje kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal és Western blottal	94.
IV.9.2.	A ribonukleotid reduktáz 2-es alegységének (RRM2) kimutatása mellékvesekéreggrákban	94.
IV.9.3.	A menin expressziójának vizsgálata mellékpajzsmirigyek daganatokban	94.
IV.10.	Bioinformatikai módszerek	95.
IV.10.1.	A mikro-RNS-ek és a cél (target) mRNS-ek közötti interakció feltérképezése	95.
IV.10.2.	Hipofízis daganatok funkcionális genomikai analízise	95.
IV.10.3.	A <i>GRβ</i> -t fokozott expresszió által befolyásolt gének útvonalelemzése	96.
IV.10.4.	A sejtciklus dependens expressziót mutató gének útvonal elemzése	96.
IV.11.	Statisztikai módszerek	96.
V.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	98.
V.1.	Örökletes endokrin tumorszindrómák patomechanizmusai, genotípus-fenotípus összefüggései	98.
V.1.1.	A <i>RET</i> protoonkogén mutációk geno-fenotípus összefüggései MEN2 szindrómában	98.
V.1.2.	A <i>VHL</i> gén eltérései hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegekben	100.
V.1.3.	A <i>VHL</i> gén Ser80Ile és a Pro25Leu variánsok patogenetikai szerepe	104.
V.1.4.	A szukcinát dehidrogenáz enzim (<i>SDH</i>) alegységeit kódoló gének (<i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> , <i>SDHAF2</i> : <i>SDHx</i> gének), <i>MAX</i> és a <i>TMEM127</i> mutációk prevalenciája hazai betegekben	105.
V.1.5.	Az <i>SDHx</i> gének aminosavcserével járó génvariánsok fenotípust módosító szerepe MEN2-es betegekben	108.
V.1.6.	Együttesen előforduló <i>SDHC</i> és <i>PTEN</i> mutációkkal társult klinikai fenotípus	110.
V.1.7.	Csírasejtes <i>SDHx</i> variánsok hatása Cowden és Cowden-szerű szindrómában szenvedő betegekben	111.
V.1.8.	A szukcinát szerepe a tumorigenézisben	115.
V.1.9.	A MEN1 szindrómáért felelős menin mutációk beazonosítása és a genotípus-fenotípus összefüggései hazai betegekben	120.
V.1.10.	MEN1 szindrómában előforduló mellékvesedaganatok valamint a menin szerepe a mellékvesekéreg daganatok patogenézisében	124.
V.1.11.	Nemzetközi együttműködés során igazolt genotípus-fenotípus összefüggései	125.
V.2.	Sporadikus daganatokban igazolt genetikai, epigenetikai eltérések és az ezekhez társult pathomechanizmus	127.
V.2.1.	A <i>C4B</i> gén kópiaszámának hatása valamint a <i>CYP21A2</i> gén gyakori variánsainak hatása az	127.

V.2.2.	ACTH stimulációt követő kortizol válaszra jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegekben A GR N363S variánsának szerepe jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenezisében, új PCR módszer a GR gén BclI polimorfizmus kimutatására	131.
V.2.3.	Nagy átereszképességű módszerek integrálása, funkcionális kapcsolatok modellezése	133.
V.2.4.	A GR izoformáinak szerepe mellékvesekéreg daganatokban	135.
V.2.5.	A mellékvesekéregben működő perifériás óra és a GR izoformák szerepe ennek modulálásában	137.
V.2.6.	A GR β izoforma szerepe a géntranszkripcióban	142.
V.2.7.	A hipofízis daganatok mikro-RNS expressziós mintázata	149.
V.2.8.	TGF β útvonal mikro-RNS-ek általi szabályozása hipofízis daganatokban	150.
V.2.9.	Emelkedett expressziót mutató mikro-RNS-ek szerepe a WEE1 kináz szabályozásában	156.
V.2.10.	A sejtciklus G2/M átmenetében szerepet játszó mikro-RNS-ek szerepe hipofízis daganatokban	161.
V.2.11.	A sejtciklus-dependens ingadozást mutató gén és mikro-RNS expresszió vizsgálata, új áramlási citometriás módszer kidolgozása a sejtek sejtciklus szerinti sejtválogatására	165.
V.2.12.	Sejtciklus-dependens módon expresszálandó, új biomarker a mellékvesekéreg rák prognózisában	172.
V.2.13.	A keringésben jelen lévő biomarkerek mikro-RNS-ek a hormonrendszer betegségeiben, a miR-483-5p a mellékvesekéreg rák specifikus markere	178.
V.2.14.	Menin expresszió és a <i>MEN1</i> 3'UTR célzó mikro-RNS-ek szerepe mellékpajzsmirigy daganatokban	181.
VI.	Az ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	186
VII	IRODALOMJEGYZÉK	189
VIII.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	231.
VIII.1.	Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben	231.
VIII.2.	Magyar nyelvű folyóiratcikkek	234.
VIII.3.	A tézisekhez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások	235.
VIII.4.	A tézisekhez kapcsolódó könyvfejezetek	235.
VIII.5.	Az értekezésben nem tárgyalt további nemzetközi és hazai közlemények időrendben	236.
VIII.6.	Összefoglaló közlemények	242
IX.	Tudománymetriai adatok	245.
X.	Köszönetnyilvánítás	248.

Rövidítések jegyzéke:

ACC: mellékvesekéreg (adrenokortikális) karcinóma

ACTH: adrenokortikotróp hormon

ANOVA: variancia-analízis (Analysis of Variance)

AUC: görbe alatti terület (Area Under the Curve)

bp: bázispár

C4: komplement komponens 4-es

cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát

CDKN1C, 1B: cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, 1B (ciklin dependens kináz inhibitor 1C ($p57^{kip2}$), 1B ($p27^{kip1}$))

CCNB1, B2, D1, E: cyclin B1, B2, D1, E (ciklin B1, B2, D1, E)

CDC2, 25A, 25B, 25C, 73: cell division cycle 2, 25A, 25B, 25C, 73

CDK1, 2, 4: cyclin-dependent kinase 1, 2, 4 (ciklin-dependens kináz 1, 2, 4)

CDKN1C: ciklin dependens kináz inhibitor 1C

cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav

CGH: komparatív genom hibridizáció

CNV: copy number variation, kópiaszámváltozást mutató kromoszomális régió

CPA: kortizol-termelő mellékvesekéreg adenóma (Cushing-adenoma)

CT: cycle threshold (cikluszám küszöb polimeráz láncreakcióban)

CYP21A2: 21-hidroxiláz enzimet kódoló gén

dCT: normalizált cycle threshold (delta cycle threshold)

DHEAS: dehidroepiandroszteron szulfát

DNS: dezoxiribonukleinsav

dsRNS: kettős szálú RNS (double stranded RNA)

FDR: False Discovery Rate (hamis felismerési arány)

FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció

FFPE: formalin-fixált paraffinba ágyazott (formaline-fixed paraffin-embedded)

FSH: follikulus stimuláló hormon

GADD45 γ : growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma/növekedés gátlás és DNS-károsodás indukálta 45 gamma gén

GAPDH: glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenáz

GR: glükokortikoid receptor

GR: glükokortikoid receptort kódoló gén

GEO: Gene Expression Omnibus

GO: Gene Ontology, gén ontológia

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis/Gécsoport Dúsulás Vizsgálata

HIF1 α , 2 α : hypoxia inducible factor 1, 2 alpha subunit (hipoxia-indukált faktor 1 α , 2 α)

HPA: hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

HPT: hiperparatireózis

IGF: inzulinszerű növekedési faktor (insulin like growth factor)

IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1 receptor)

IGF-2: insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) (inzulinszerű növekedési faktor 2)

IL: interleukin

IPA: Ingenuity Pathway Analysis

LH: luteinizáló hormon

LOH: heterozigócia elvesztése (loss of heterozygosity)

MAPK: mitogén aktiválta protein kináz

MAX: Myc-associated X gén

MEN1: multiplex endokrin neoplázia 1-es típusa

MEN2: multiplex endokrin neoplázia 2-es típusa

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)

mRNS: hírvivő ribonukleinsav (messenger RNA)

miRISC: mikro-RNS indukálta csendesítő komplex (miRNA induced silencing complex)

miR, miRNS : mikro-RNS

MTC: medulláris pajzsmirigy carcinoma

mTOR: mammalian target of rapamycin

MYCN: v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived

NA: normális (ép) szövet

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NF1: 1-es típusú neurofibromatózis

NFA, NFPA: nem funkcionáló hipofízis adenoma

nt: nukleotid

PCR: polimeráz láncreakció

Phaeo: pheochromocytoma

PGL: paraganglioma

PGL1-4: familiáris paraganglioma szindróma 1-4 típus

PHD: prolyl-hidroxiláz enzim

PKA: protein kinase A, cAMP-dependent (cAMP-dependens protein kináz)

PPNAD: primer pigmentált noduláris adrenális hyperplasia (primary pigmented nodular adrenal disease)

PRKAR1A: protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1) (cAMP-dependens protein-kináz RI α inhibitor alegység)

PRKAR1A: protein kináz A (PKA) RI α alegységét kódoló gén

RCCX modul: human MHC III-as régióban tandem elhelyzkedést mutó gének kezdőbetűiből álló moziakszó (**RP**, complement **C4**, steroid 21-hydroxylase (**CYP21**), and tenascin X (**TNX**)).

RET: rearranged during transfection gén

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű (real-time) reverz transzkripció polimeráz láncreakció (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

RIN: RNS integritás szám (RNA Integrity Number)

RISC: RNS-indukált csendesítő komplex (RNA induced silencing complex)

RNS: ribonukleinsav

ROC: Receiver Operating Characteristics Analysis

RT: reverz transzkripció

SD: standard deviáció

SDH: szukcinát dehidrogenáz

SDHx: szukcinát dehidrogenáz enzim alegységeit kódoló gének (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* és *SDHD*)

SEM: átlag szórása (standard error of mean)

siRNS: kis interferáló RNS (small interfering RNA)

SNP: egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

TLDA: TaqMan Low Density Array

TMEM127: transzmembrán fehérje 127-t kódoló gén

TNF- α : tumor nekrozis faktor α

TOP2A: topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa (topoizomeráz 2A)

3' UTR: 3' nem transzlálódó régió (3' untranslated region)

5' UTR: 5' nem transzlálódó régió (5' untranslated region)

VEGF: vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)

VEGF-R: vascular endothelial growth factor receptor (vascularis endoteliális növekedési faktor receptor)

VHL: von Hippel-Lindau szindróma

VHL: von Hippel-Lindau tumor suppressor (von Hippel-Lindau gén)

WNT: wingless-type MMTV integration site family

XPO1: exportin 1

I. BEVEZETÉS

A hormonrendszer daganatainak jelentős része társul monogénes, autoszomális domináns módon öröklődő génhibákhoz. A betegségek kialakulásáért felelős mutációt hordozó egyének szoros klinikai nyomonkövetésével és az egyes szindrómák esetében preventív műtétekkel a daganatok kialakulása megelőzhető. A betegségért felelős elváltozások kimutatása jelenti a molekuláris genetikai diagnosztikai laboratórium fő feladatát. Kutatómunkám elején a PhD munkám során elkezdett munkát folytattam, amelynek célja az volt, hogy genetikai vizsgálatokkal beazonosítsam a mutációt hordozó betegeket és a genotípus-fenotípus összefüggések alapján a klinikai ellátásban is hasznosítható új adatokat tárjunk fel. Számos szindróma esetén a betegség- okozó géneltérés pontmutáció, amelyek beazonosítása hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel polimeráz láncreakciót (PCR) követő bidirekcionális Sanger szekvenálással történik. Ugyanakkor azonban, a tumorszupresszor gének eltérései lehetnek ún. heterozigóta deléciók is (pl. a *VHL*, *SDHx* gének esetén), amelyek kimutatásához egyéb speciálisabb, kvantitatív meghatározást is biztosító módszerek szükségesek. Ezek bevezetése, validálása és alkalmazása a molekuláris genetikai diagnosztikába szintén munkám részét képezte. Az örökletes endokrin daganatok egyik legizgalmasabb típusa a phaeochromocytoma és paraganglióma (Phaeo/PGL) daganatok. A daganatok kb. 30%-áért valamilyen örökletes génhiba tehető felelőssé és számos szoros genotípus-fenotípus összefüggés is ismertté vált. Ezek közül kiemelendő, hogy az *SDHB* génmutációkhoz társuló esetekben rendkívül magas a daganatok malignus elfajulása és a terápiás lehetőségek erősen korlátozottak. A kutatómunkám során a Phaeo/PGL gének mutáció analízise, a betegek folyamatos nyomonkövetése a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika klinikus kollégáinak szoros együttműködésével egy több mint 100 betegből álló adatbázist sikerült kialakítani, ami a genotípus-fenotípus összefüggések elemzésében nyújtott kiváló lehetőséget.

Az örökletes tumorszindrómák közül a Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es és 2-es típusai, a von Hippel-Lindau szindróma és az Örökletes Phaeochromocytoma/paragangliómák (Phaeo/PGL) háttérében álló *MEN1*, *RET* protoonkogén, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2* gének, valamint a 2000-es évek második felében, az új generációs szekvenálásával beazonosított gének (*MAX*, *TMEM127*) vizsgálatát végeztük el hazai betegeken, ami hozzájárult a hazai betegeken előforduló mutációs spektrum megismeréséhez, valamint a mutációt hordozó betegeken és családtagjaiban a nemzetközi ajánlásoknak megfelelő egyénre szabott diagnosztikai és terápiás javaslatok alkalmazásához. A *MEN2* és az örökletes Phaeo/PGL szindróma közös eltérése a phaeochromocytoma (Phaeo). Az örökletes endokrin daganatszindrómák jól ismert közös sajátossága, hogy még ugyanazt a csírasejtes mutációt hordozókban is eltérő lehet a különböző manifesztációk penetranciája. Ez arra utal, hogy egyéb tényezők, akár genetikai, epigenetikai illetve

környezeti hatások is szerepet játszhatnak ennek befolyásolásában. Az *SDHx* gének gyakoribb, de funkcionális hatással bíró eltéréseiről igazolódott, hogy számos kórképben bírnak genetikai módosító hatással. Az *SDHx* gének gyakoribb variánsainak előfordulásáról és a MEN2 szindrómában betöltött esetleges szerepükről nem állt rendelkezésre információ.

Az örökletes endokrin daganatos kórképek **ritka betegségek**. Ezért, ahhoz, hogy releváns genotípus-fenotípus összefüggéseket ismerjünk fel szükséges a nagyobb esetszámú vizsgálatok elvégzése. Munkám egyik fontos része volt, hogy az Amerikai Egyesült Államok és Nyugat Európa-i vezető endokrin központjaival kollaborációkat alakítottunk ki, amelyek keretén belül számos tanulmányt készítettünk a pontos genotípus-fenotípus összefüggések megállapításáért. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei hozzájárultak az örökletes endokrin daganatos szindrómákkal kapcsolatos szakmai ajánlások felülvizsgálatához és az újonnan felismert gének szerepének tisztázásához. Az örökletes szindrómák prevalenciája ismeretlen volt gyermekkorban és nem álltak rendelkezésre olyan adatok sem, amelyek az örökletes Phaeo/PGL-ákban az első daganat eltávolítása után mikor kell számítani a következő megjelenésre, valamint mi a különböző génhibáknak a hatása a progresszióra és túlélésre. A kezelésben egy óriási kihívás a mellékvese műtét. Az örökletes esetekben mindkét mellékvese érintett lehet, ugyanakkor ezeknek a daganatoknak a kezelése a daganatok sebészi eltávolítását jelenti. Mellékvesevelő tumorok esetében a műtét a teljes mellékvesék kivételét jelenti, ami kétoldali esetekben az élethosszig tartó hormonpótlást vonja maga után. A mellékvesék eltávolítása helyett azonban az újabb sebészi lehetőségek igazolták, hogy a daganatok eltávolítása lehetséges a mellékvesekéreg megtartása mellett is. Az ehhez a műtéti típushoz kapcsolódó hosszútávú adatok a betegség progressziójáról, a betegek életminőségéről hiányoztak, így a kooperáció egyik célja volt összehasonlítani a műtéti technikákhoz kapcsolódó hosszútávú következményeket.

Az örökletes kórképek mellett az endokrin daganatok zöme **sporadikus daganat**, vagyis patogenezisükben nem azonosítható örökletes génhiba. Ugyanakkor pl. a mellékvesekéreg daganatok kialakulásával kapcsolatban felmerült az ún. **genetikai hajlamosító tényezők** szerepe, mint patogenetikai okok. Munkám során a jóindulatú, hormonálisan inaktív és jobbára véletlenszerűen felfedezett mellékvesekéreg daganatok kialakulására, biokémia és genetikai jellegzetességére fókuszáltam. A munkának a fő indikációját az jelentette, hogy ezek a daganatok gyakoriak, az egyéb célból végzett hasi képalkotó vizsgálatok mintegy 8-20%-ában kerülnek felismerésre és számos diagnosztikai és terápiás nehézséget jelentenek. Genetikai hátterük tisztázatlan, bár már PhD munkám során is felmerült, hogy a kóros glükokortikoid hatás és a kontrollálatlan hormonszekréció szerepet játszhat patogenezisükben. Kutatómunkám egyik fontos célja volt a helyi, a szöveti glükokortikoid hatásban prerreceptoriális és receptoriális szinten zajló glükokortikoid hatás elemzése ezekben a betegekben. Korábbi vizsgálataim során a

mellékvesekéreg enzimek bioszintézisében kulcsszerepet játszó 21-hidroziláz enzimet kódoló gén a **CYP21A2** eltéréseit igazoltam egy és kétoldali mellékvesekéreg adenómás betegekben, ami megerősítette, hogy a kóros szteroid bioszintézisnek is szerepe lehet ezeknek a daganatoknak a kialakulásában. Későbbi munkám során vizsgálatainkat kiterjesztettük a *CYP21A2* gén tágabb kromoszomális régiójának vizsgálatára is. A *CYP21A2* gén a komplement komponens 4-est kódoló *C4* gén közelében helyezkedik el. A *CYP21A2* génnek ismert egy vele nagyfokú homológiát mutató pszeudogénje a *CYP21A1*, ami megnehezíti a genetikai vizsgálatokat. A *C4* génnek is két változata a *C4A* és a *C4B* létezik, amelyek a *CYP21* génnek egymást felváltva helyezkednek el, egy speciális kromoszóma szerkezetben, az RCCX modulban, ami egy kópiaszám változást mutató régió (copy number variation: CNV) része. A CNV-k vizsgálata komplex, a hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel korlátozottan kivitelezhető. Ezért munkánk során több új metodika kialakítására és alkalmazására került sor, amelyek segítségével a teljes CNV régió és ezen belül a *CYP21A2* gén gyakori variánsainak a szteroid hormon koncentrációkra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A kóros glükokortikoid hatás szerepe felmerült a mellékvesekéreg adenómák patogenézisében. A mellékvesekéreg daganatos betegekben gyakran megfigyelhető elváltozások (elhízás, cukorbetegség, magasvérnyomás) hasonlóak azokhoz, amelyek a fokozott glükokortikoid hatás során is kialakulnak Cushing szindrómás betegekben. A daganatok kétoldali megjelenése valamilyen szisztémás eltérésre utalhatnak. Ezek a klinikai megfigyelések vetették fel, hogy a mellékvesekéregben a lokálisan termelődő glukokortikoidok és a hatás közvetítéséért felelős GR-nak szerepe lehet a jóindulatú kéregadenómák patogenézisében. A **glükokortikoid receptor** (GR) felelős a szteroid hatás közvetítésért. A hatás **receptorális szintjének** vizsgálata során a *GR*-t kódoló gén genetikai variánsait, valamint fehérje izoformáit vizsgáltuk mellékvesekéreg daganatos betegekben. A *GR*-t kódoló génnek számos olyan variánsa ismert, amelyek eltérő receptor affinitással bírnak. Egyes variánsok, mint pl. az N363S és az ún. BclI a fokozott, míg az ER33/34EK és az ún. GR β variáns a csökkent érzékenységgel mutatott összefüggést. Ezeknek az SNP-nek az esetleges asszociációról mellékvesekéreg daganatokkal nem állt rendelkezésre irodalmi adat.

A GR-nak több izoformája ismert, amelyek közül a GR α és GR β a két leggyakoribb. A fiziológiás hatás közvetítéséért a GR α a felelős. A **GR β izoforma** megjelenését összefüggésbe hozták a glükokortikoidok iránti rezisztencia kialakulásával. Több olyan kórképben mutatták ki expressziójának emelkedését, amelyekben a glükokortikoidok iránti rezisztencia is megjelent (pl. szteroid rezisztens asztma, gyulladásos bélbetegség). A GR-hoz kapcsolódó mechanizmusok vizsgálata során elsőként igazoltuk a GR β izoforma expresszióját mellékvesekéregben. Mind a GR α és GR β fokozott expresszióját mutattunk ki a kortizolt termelő daganatokban a normál

mellékvesekéreghez képest. A GR β expressziójának megjelenése kortizolt termelő daganatokban felvetette, hogy a GR-nak szerepe lehet az intraadrenalis glükokortikoid elválasztás szabályozásában is, és a GR β , mint egy domináns negatív izoforma szerepet játszhat az intraadrenalis glükokortikoid hatásban. A GR β -ról bizonyított, hogy gátolja a GR α hatását, de ellentmondásos adatok álltak rendelkezésre arról, hogy a géntranszkripciót hogyan szabályozza. Ennek tisztázására létrehoztunk egy stabil sejtvonalat, ami fokozottan expresszálja a GR β izoformát, és ennek felhasználásával vizsgáltuk a szteroid rezisztencia mechanizmusát.

Az örökletes genetikai tényezők talaján kialakuló pathomechanizmusok jól ismertek. A *RET* protoonkogén egy tirozin kináz receptort kódol, ami a MEN2 szindrómát okozó mutációk révén konstitutívan aktiválódik. A von Hippel-Lindau szindrómáért felelős VHL a hipoxia indukálható faktor 1 α (HIF1 α) lebontásában szerepet játszó mechanizmusban vesz részt, ami a gént érintő mutációk révén károsodik, amelynek következtében a HIF1 α stabilizálódik. Az örökletes Phaeo/PGL háttérben álló *SDHx* gének eltérései a szukcinát dehidrogenáz enzim károsodása révén mitokondriális disszfunkciót eredményeznek. A felhalmozódó szukcinát gátolja a prolyl-hidroxiláz enzimeket (PHD), pl. a 2-es típusú PHD-t, ami a HIF1 α hidroxilálást végzi. *SDHx* mutációk következtében a szukcinát akkumulálódik és a HIF1 α stabilizálódik (pszeudo-hypoxia mechanizmus). *SDHx* mutációkhoz társult Phaeo/PGL tumorszövetek génexpressziós mintázata hasonlított a *VHL* mutációkhoz társult Phaeo-kban igazolt mintázatokkal, ami megerősíti ennek a mechanizmusnak a szerepét az *SDH* mutációkhoz társult daganatokban. Ugyanakkor a **hormonális rendszer sporadikus előfordulású daganataiban zajló molekuláris mechanizmusok** kevésbé ismertek.

A sporadikus előfordulású daganatokban több tumortípus esetében igazolták az ún. **mikro-RNS-ek** általi szabályozás szerepét a daganatok patogenezisében. Ezek az adatok a mikro-RNS expresszió vizsgálataiból eredtek, amelyek megváltozott mikro-RNS kifejeződést mutattak ki a daganatok és a normális szövetek között. A 20-24 nukleotid hosszúságú kis RNS-ek (mikro-RNS-ek) a génexpressziót posztranszkripciósszerű módon szabályozzák, azáltal, hogy képesek kötődni a fehérjéket kódoló géneket kódoló hírvivő RNS-ekhez (mRNS) és a mikro-RNS-mRNS interakció révén gátolják a translációt vagy az mRNS-ek lebontását okozzák. A különböző szövetekben és különböző élettani folyamatok során is a mikro-RNS-ek expressziós mintázata dinamikusan változik. A mikroRNS kutatás nem állhat meg a beazonosított mikroRNS-ek szintjén, hiszen a kórosan felszaporodott vagy akár a kórosan csökkent expressziót mutató mikro-RNS-ek biológiai hatásainak kimutatásához szükségesek egyéb, pl. génexpressziós, fehérje expressziós vagy *in vitro* funkcionális vizsgálatok is. A releváns biológiai hatás igazolására komplex vizsgálatokra ún. **nagy áteresztőképességű** módszerekkel kapott eredmények integrálására, bioinformatikai adatfeldolgozásra majd egyidejű *in vitro* funkcionális vizsgálatok elvégzésére van szükség. A

mikro-RNS-ekhez kapcsolódó egyik legjelentősebb probléma az adott mikro-RNS-hez tartozó **cél mRNS-ek azonosítása**. A mikro-RNS-ek potenciális célgénjeinek azonosításához (**target predikció**) ún. predikciós algoritmusokat használnak. Általában ezek az algoritmusok többféle adat alapján becsülik meg a potenciális kapcsolatot, de fontos megjegyezni, hogy egy mikro-RNS-hez is több ezer célgén is prediktálható, ami felelős lehet azért a klinikai megfigyelésért, hogy ugyanakkor a mikro-RNS-ek teljesen eltérő hatása lehet más szövetben.

Kutatómunkám során a mikro-RNS-ek szerepét **hipofízis adenomákban vizsgáltuk**. A hipofízis daganatok többnyire sporadikus megjelenésűek, mindössze 5%-ban jelentkeznek familiáris formában. Kialakulásukban hipotalamikus és hipofízis eredetű okokat feltételeznek. A primer molekuláris biológiai elváltozásra utal az a megfigyelés, hogy a legtöbb sporadikus adenoma monoklonális, de feltételezhető, hogy a primer defektus kialakulása után a daganatos sejtklónok növekedésében szerepet játszanak a hipotalamusz felől érkező stimulusok is. Vizsgálataink egybeestek a molekuláris biológiai módszerek rohamos fejlődésével. A hagyományos molekuláris biológiai módszerek mellett az utóbbi években előtérbe kerültek az ún. nagy áteresztőképességű technológiák használata. A teljes genom gén és mikro-RNS expresszió, valamint az adatok integrálásával és bioinformatikai feldolgozásával olyan biológiai folyamatok kerülhetnek beazonosításra, amelyek a korábbi egy-egy gént, molekulát célzó vizsgálatokkal rejtve maradtak. Hipofízis vonatkozásában a mikro-RNS-ekre vonatkozóan a növekedési hormont és ACTH-t termelő tumorok esetében voltak előzetes eredmények. Ezek igazolták, hogy a hipofízis gazdag mikro-RNS-ekben. Ugyanakkor a hormont nem termelő, inaktív hipofízis adenóma esetében (non-functioning pituitary adenoma: NFPA) nem volt ismert a mikro-RNS-ek szerepe.

A hipofízis daganatokban beazonosított mikro-RNS-ek, valamint a kutatócsoport korábbi, mellékvesekéregregrákban igazolt mikro-RNS mintázat a sejtciklus szabályozási zavarára utalt ezekben a daganatokban. A **sejtciklusnak** az eukarióta sejtek ismétlődő növekedési és osztódási folyamata, ami szigorúan szabályozott. Az egymást követő fázisok felkészítik a sejtet a sikeres megkettőződésre, ami a növekedés, fejlődés és differenciálódás előfeltétele. A sejtciklus optimális működését három ellenőrzőpont biztosítja; a restrikciós ponton átjutva exogén és endogén szignálok eredőjeként köteleződik el a sejt a “minden-vagy-semmi” elve alapján az osztódás irányába. A DNS sikeres és hibátlan megkettőződése az előfeltétele a G2/M ellenőrzőpont sikeres átlépésének. Megváltozott sejtciklus dinamika a daganatos sejtekre jellemző. Általánosságban elmondható, hogy a sejtciklust hajtó ciklinek és ciklin-dependens kinázok (CDK) fokozott, míg a ciklin-depenens kináz inhibitorok (CDKI) és egyéb tumor szuppresszor gének csökkent kifejeződése figyelhető meg a daganatokban az ép szövetekhez képest. Tumorszuppresszor mikro-RNS-ek elvesztése és az ún. onkomiR-ek (onkogén mikro-RNS-ek) felszaporodása a daganatokban a sejtciklus felgyorsulását, a proliferáció fokozódását eredményezi. Kutatómunkánk során megfigyeltük, hogy a

hormonrendszer daganatai közül a sporadikus hipofízis és mellékvesekéreg karcinómában is a megváltozott mikro-RNS expressziót mutató mikro-RNS-ek olyan géneket céloznak, amelyek a sejtciklus szabályozásában játszanak kritikus szerepet.

A sejtciklus transzkripció programjának vizsgálata bonyolult feladat, hiszen kezeletlen sejttenyészetekben a különböző sejtek aszinkronizáltak, a sejtciklus különböző fázisaiban vannak, így natív sejttenyészetek expressziós vizsgálatával nem tudunk betekintést nyerni a sejtciklus-dependens transzkripció programba. Ezért a **sejtciklus-dependens transzkripció program jellemzéséhez** olyan sejtszövetek szükségesek, melyek azonos fázisokban vannak. Ennek elérésére különböző kezelések használatosak, amelyek az alap transzkripció programot is befolyásolhatják, így az eredmények csak korlátozottan reprezentálják a valódi sejtciklus-dependens expresszióváltozást. Kutatómunkánk során az egyik fontos feladat volt olyan vizsgáló módszer kidolgozása, amivel a sejtciklus fázisai szerint tudunk elegendő számú sejtet nyerni, amelyekből megfelelő mennyiségű RNS-t lehet izolálni teljes genomos vizsgálatokhoz. A mikro-RNS-ek expresszióinak dinamikus, sejtciklus-dependens módon történő módjáról nem álltak rendelkezésre adatok. A sejtválogatásos módszer felhasználásával nyert sejtekben több nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai módszert használva a világon elsőként vizsgáltuk a mikro-RNS expresszió sejtciklus-dependens változásait normális és daganatos sejtekben.

A stabil kifejeződést mutató mikro-RNS-ek alkalmasnak tűnnek biomarkerként történő alkalmazásra. A hormonrendszer daganatai közül a **mellékvesekéregrák** egy rendkívül rosszindulatú daganat, amelynek felismerése és kezelése is óriási kihívást jelent. A kutatócsoportunk korábbi munkái során több olyan mikro-RNS-et is talált, amelyeknek az expressziója a rákban magasabb volt mint az ép szövetben és expressziójuk mérése felvetette biomarkerként történő alkalmazásukat. Ezek közül a mikro-RNS-ek közül számos a keringésben is jelen van. Ugyanakkor a mellékvesekéregből történő kiürülésükben a hormonhatások szerepet játszhatnak. A mellékvesekéreg daganatok laboratóriumi kivizsgálása során számos stimulációs endokrin vizsgálatra is sor kerül, ami befolyásolhatja a mellékvesekéregből ürülő mikro-RNS-ek mennyiségét is. A keringésben jelen lévő mikro-RNS-ek meghatározása során a preanalitikai és analitikai tényezők egységesítése szükséges. Munkám során a mellékvesekéreg rák esetében felmerült keringő mikro-RNS-ek hormonhatásra bekövetkező változására fókuszáltam.

Összekapcsolva a genetikai, örökletes mutációkhoz kapcsolódó pathomechanizmust az epigenetikai szabályozással vizsgálatot végeztünk mellékpajzsmirigy adenómákban. A MEN1 szindróma vezető tünete a mellékpajzsmirigy adenóma. Ugyanakkor szomatikus *MEN1* mutációkat azonosítottak a sporadikus mellékpajzsmirigy daganatok kb. egy harmadában is, ami alátámasztja a *MEN1* kritikus szerepét ezekben a daganatokban. A *MEN1* által kódolt gén a *menin* tumorszuppresszor fehérjét kódolja, a tumorigenézis a Knudson féle két ütés elmélet szerint

következik be. MEN1 szindrómában a daganatok kialakulásáért a *MEN1* gén csírasejtes mutáció után a szövetben bekövetkező normális allél elvesztése, mutációja vagy egyéb úton bekövetkező géncsendesítés szükséges a tumor kialakulásához. Ezeknek a folyamatoknak az eredménye a menin fehérje hiánya a *MEN1*-hez társult esetekben. A menin expressziójáról mellékpajzsmirigy daganatokban csekély információ állt rendelkezésre és szintén nem volt ismert a MEN1 szindrómához és a sporadikus mellékpajzsmirigy adenómákban a potenciálisan *MEN1* 3'UTR-t célzó mikroRNS-ek expressziója. Ennek tisztázására immunhisztokémia és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk MEN1-asszociált és sporadikus mellékpajzsmirigy daganatokban.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. Örökletes endokrin tumorszindrómák

Az örökletes endokrin tumor-szindrómák közös jellemzője a különböző szerveket érintő daganatok specifikus társulása és családi halmozódása. A sporadikus esetekhez képest az örökletes daganatok fiatalabb életkorban jelentkeznek, nagyon gyakran multiplex előfordulásúak és gyakrabban recidiválnak. Kezdetben két fő típusát különböztettük meg: a Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es és 2-es típusait. Ugyanakkor a hormon rendszer érintettsége, a mellékvesevelőből kiinduló phaeochromocytóma miatt a von Hippel-Lindau szindróma, a Neurofibromatózis 1-es típusa és az Örökletes Pheochromocytoma /paraganglióma szindrómák is az örökletes tumorszindrómák közé tartoznak. Klinikai genetikai szempontból közös jellemzőjük az autoszomális domináns öröklődésmenet, ami azt jelenti, hogy az érintett családokban a mutáció öröklődésének az esélye 50%. A betegségért felelős mutációk beazonosításával a klinikailag még tünetmentes egyéneken preventív beavatkozásokkal a daganatokhoz kapcsolódó morbiditás és mortalitás jelentősen csökkenthető.

II.1.1. A Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es típus

II.1.1.1. Definíció, klinikai megjelenés

A MEN 1 szindróma (Wermer-kór) (OMIM 131100) három fő komponense a primer hyperparathireózis (általában többszörös mellékpajzsmirigy adenoma vagy hyperplasia), az enteropankreatikus neuroendokrin daganat és a hipofízis adenoma, azonban a szindrómához előbél karcinoid tumor, mellékvese daganat, valamint nem endokrin szervek daganatai is társulhatnak (1. táblázat) [1]. A tünetek nagymértékben függenek a daganatok lokalizációjától, illetve azok hormontermelő sajátosságaitól [2].

A MEN1 szindróma ritka kórkép, nemzetközi irodalmi adatok alapján prevalenciája kb. 1/30000 [3]. A betegek több mint 95%-ában a betegség első manifesztációi az ötödik évtizedig megjelennek.

A MEN1 szindróma klinikai diagnózisa kimondható, ha a 3 fő komponens közül legalább 2 jelen van. MEN1 szindrómás családnak tekintjük azt a családot, amelyben legalább egy MEN1 szindrómás családtagon kívül legalább egy elsőfokú vérrokon családtagnak a 3 fő MEN 1 komponens közül legalább 1 előfordul. Fontos megfigyelés, hogy a mutációk egy része *de novo* alakul ki, ezért negatív családi anamnézis nem zárja ki MEN1 szindróma lehetőségét [4]. Nemzetközi ajánlások szerint MEN1 szindróma gyanúja akkor megalapozott, ha bármely fő lézió fiatal korban (<35év) jelentkezik, vagy multiplex formában fordul elő, illetve ha egy fő lézió mellett legalább egy MEN 1-asszociált minor eltérést is találunk [5].

1. táblázat: A MEN 1 szindrómához társuló daganatok relatív gyakorisága* [2]

Endokrin daganatok	
▪ Mellékpajzsmirigy adenoma	90 %
▪ Enteropankreatikus daganat	
○ Gastrinoma	40%
○ Insulinoma	10%
○ Egyéb hormontermelő daganat	2%
○ Nem hormontermelő daganat	20%
▪ Hipofízis daganat	
○ Prolaktinoma	20%
○ GH- és prolaktin-termelő adenoma	5%
○ GH-termelő adenoma	5%
○ ACTH-termelő adenoma	2%
○ TSH-termelő adenoma	ritka
○ Nem hormontermelő adenoma	5%
▪ Előbél carcinoid	
○ Thymus carcinoid	2%
○ Bronchus carcinoid	2%
○ Gyomor ECL sejt carcinoid	10%
▪ Mellékvesekéreg	
○ Primer aldosteronizmus	ritka
○ Cushing szindróma	ritka
○ Nem hormontermelő daganat	25%
Nem endokrin daganatok	
▪ Lipoma	30%
▪ Angiofibroma (arcon)	85%
▪ Kollagenoma	70%
*40 év feletti életkorban, MEN1 szindrómás betegben, (ECL sejt: entrochromaffin-szerű sejt)	

A MEN1 szindróma klinikai diagnózisa esetén a MEN1 gén vizsgálata indokolt. Számos egyéb esetben pl. ismert MEN1 mutációthordozó családokban, vagy fiatal életkorban megjelenő sporadikus, a MEN1 szindrómában is előforduló daganatok megjelenése esetén is szükséges a genetikai vizsgálat. A mutációanalízis indikációit a 2-táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A *MEN1* gén mutációanalízisének indikációi [Brandi és mtsai 2001]

A genetikai szűrés indikációi
<u>Index eset (proband):</u>
▪ Klinikailag definiált MEN1 szindróma (sporadikus vagy familiáris formában: 2 major lézió, vagy 3 major és/vagy minor eltérés)
▪ Klinikailag gyanús, vagy atípusos MEN1 szindróma 2 vagy több MEN1-tumor; multiplex mellékpajzsmirigy tumor 30 éves kor alatt; eredményes műtét után kiújuló hyperparatireózis; gasztrinóma vagy multiplex pankreasz szigetsejt tumor bármely életkorban (Familiaris izolált hyperparatireózis.)
<u>Ismert <i>MEN1</i> mutációval rendelkező egyén vérrokon családtagjai:</u>
▪ Minden tünetmentes vérrokonnál
▪ Bármely rokonnál, aki a MEN1 szindróma bármely jelét mutatja (megerősítésként)
<u>Klinikailag MEN1 szindrómás betegben, <i>MEN1</i> mutáció hiányában :</u>
▪ Mint fent, csak a <i>MEN1</i> mutációanalízis nem hozzáférhető; abban az esetben is ez az ajánlás, ha a genetikai szűrés negatív*

A MEN 1 szindróma az egészséges populációhoz képest a morbiditás és mortalitás jelentős növekedésével jár. A betegek 28 %-ában a mortalitás a MEN1 szindróma részjelenségeire, illetve azok közvetlen szövődményeire vezethető vissza (gasztrinóma esetében gastrointestinalis vérzés, inzulinóma esetében hipoglikémia, stb.). Valószínűnek tartják azonban, hogy a MEN1 szindrómával közvetlenül nem összefüggő halálozásban a betegséghez társuló metabolikus és elektrolit eltéréseknek is jelentős szerepe lehet (pl. a hyperparatireózis miatt kialakuló hyperkalcémia miokardiális kalcifikációt, magas vérnyomást, bal kamra hipertófiát okozhat, sőt az emelkedett parathormon szint közvetlenül szívizomsejt hipertrófiát is kiválthat [6,7].

A MEN1 mutációt hordozókban folyamatos klinikai nyomonkövetés javasolt a MEN1-asszociált léziókhöz kapcsolódó morbiditás megelőzése érdekében. Ennek mikéntjét a 2-es táblázat tartalmazza.

3. táblázat MEN1 szindróma esetén végzendő szűrővizsgálatok időpontja és módja (Brandi alapján)

Tumor	Szűrés kezdetéhez tartozó életkor (év)	Évente elvégzendő biokémiai teszt (plazma vagy szérum)	Képalkotó vizsgálat (ismétlés gyakorisága)
Mellékpajzsmirigy	8	Kalcium, PTH	nincs
Pankreász neuroendokrin tumorai			
Gasztrínóma	20	Gasztrín ($\pm$ gyomor pH)	nincs
Inzulinóma	5	Éhgyomri glükóz és inzulin	nincs
Egyéb	<10	Kromogranin-A, pankreász polipeptid, glukagon, VIP	MRI, CT vagy EUH (évente)
Elülső hipofízis tumorok	5	prolaktin, IGF-1	MRI (3 évente)
Mellékvese	<10	Nincs, kivéve a funkcionáló tumorok tünetei és/vagy képalkotó vizsgálattal azonosított, 1 cm> tumorok esetén	MRI vagy CT (évente)
Tímusz és bronhus karcinoid	15	Nincs	CT vagy MRI (1-2 évente)

II.1.1.2. MEN1 szindrómáért felelős gén és a társult patomechanizmus

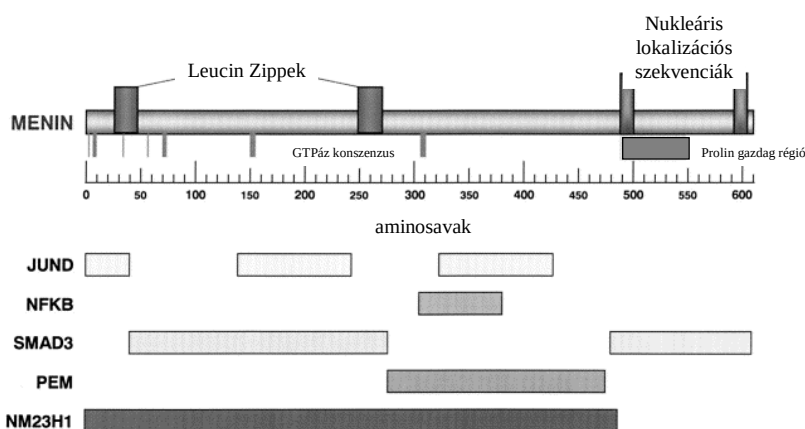
A MEN1 szindrómáért a *MEN1* tumorsuppresszor gén csírasejtes mutáció felelősek. A gén a 11q13 kromoszómarégióban található; 10 exont tartalmaz, amelyből az első és a 10. exon második fele nem íródik át. A kódoló szakasz 1830 bp méretű [8]. Az eddigi vizsgálatok során összesen több mint 500 mutációt írtak le a gén területén [9]; ezek legtöbbje csonkolt fehérje kialakulásához vezet. A gén területén nincs mutációs "hot spot", és eddig genotípus-fenotípus összefüggést sem sikerült felfedezni [10,11].

A gén egy 610 aminosavból álló fehérjét, a menint kódolja. A menin nem mutat homológiát az eddig ismert fehérjékkel; funkciójáról csekély információ áll rendelkezésünkre. A menin tumor suppresszor fehérje, a betegségre jellemző endokrin daganatok mindkét allél defektusa esetén alakulnak ki (Knudson-féle "két ütés" modell). Az érintett egyénekben típusosan az egyik allél veleszületett mutációján kívül a daganatszövetben a másik allél szerzett, szomatikus defektusa alakul ki (rendszerint allél-vesztés; LOH: a heterozigótaság elvesztése) [12]. Szomatikus *MEN1* gén mutációk a MEN 1 szindrómához társuló endokrin daganatokon kívül sporadikus endokrin daganatokban is előfordulhatnak (VIPomák 50 %-ában, hipofízis adenomák 40 %-ában, bronhus karcinoidok 25-35 %-ában, gasztrínómák 25 %-ában, inzulinomák, nem funkcionáló pankreasz neuroendokrin tumorok és mellékpajzsmirigy adenomák 10-20 %-ában, angiofibromák és lipomák 10-17 %-ában) [13–15]. Családi anamnézis hiányában is kialakulhat a későbbiekben öröklődő csírasejtes *MEN1* mutáció, ilyen esetekben a betegséget rendszerint *de novo* mutáció okozza (4. ábra).

A homozigóta *menin*-null egerek embrionális korban 10.5 és 12.5 nap között elpusztulnak, ezért a *menin* hiányát az étellel összeegyeztethetetlennek tartják. Heterozigóta gén-kiütött egerek 24%-ában 9 hónapos korra mellékpajzsmirigy adenoma alakul ki, bár a szérumban kalcium szint nem változik. 16 hónapos egerek 26%-ában nagy hipofízis adenoma, 22 hónapos korukra pedig 28%-ukban hasnyálmirigy szigetsejt adenoma alakul ki; utóbbiak nagy része (83%) inzulinóma. A heterozigóta gén-kiütött egerek 20%-ában mellékvesekéreg karcinómát is találtak [16].

A *menin* nukleáris fehérje; szerkezetén belül más fehérjékkel való interakcióhoz szükséges területeket azonosítottak, melyeken keresztül a *menin* hatásai érvényesülhetnek (*menin* interakciós fehérjék, MIP), amelyek a tumorigenézis szempontjából is jelentősnek tűnnek.

A *menin* gátolja a JunD által mediált transzkripció aktivációt. A JunD fehérje az AP-1 családba tartozó transzkripciós faktor. A többi AP-fehérjétől eltérően a sejtnövekedésre gátló/szabályozó hatást fejt ki. A *menin* antagonista hatása ezért nem egyértelműen magyarázható tumorsuppresszor hatással, ugyanis egy sejtnövekedést gátló hatást gátol, ami (eddig ismeretlen módon) szabályozza a transzkripciót és az apoptózist [17]. Ugyanakkor mind a *menin*, mind JunD gátló hatással bír a RAS (patkány szarkóma protoonkogén) indukált daganatképződésre. Kimutatták továbbá, hogy a JunD proapoptotikus faktorként szerepel a p53 jelátvitelben. Felmerül annak a lehetősége is, hogy a JunD két ismert izoformájához a *menin* nem egyforma affinitással kötődik [18,19].



1. ábra: A *menin* fehérje szerkezeti doménjei [20]. Az ábra felső részén a *menin* fehérje szerkezetében azonosított domének láthatók; ezek alatt a téglalapok a *menin* fehérjével kölcsönhatásba lépő fehérjék kötési helyeit illusztrálják.

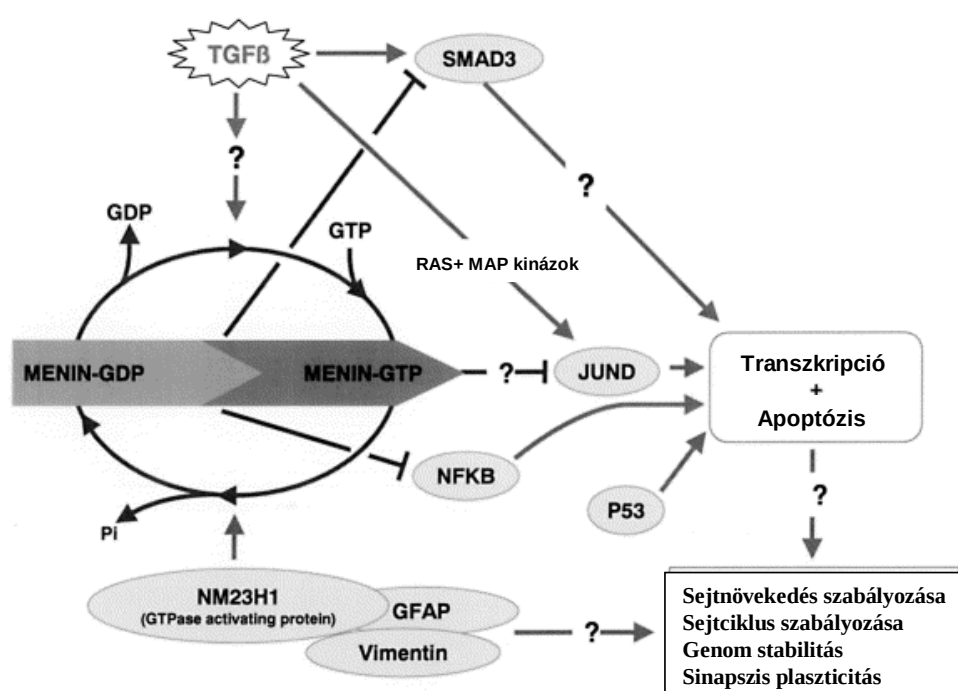
A *menin* az NF- κ B nukleáris faktor család három tagjával lép kölcsönhatásba (NF-KappaB1, -B2 és a RelA transzkripciós regulátorok). Ezek a fehérjék homo- és heterodimerek formájában számos gén expresszióját szabályozzák. A *menin* a JunD-hez hasonló hatást fejt ki: gátolja az NF-KappaB által szabályozott transzaktivációt. A JunD és NF-KappaB együttműködését (és direkt kölcsönhatását) patkány hepatocytákban bizonyították. Kaji és mtsai kimutatták, hogy a

menin a TGF- β jelátvivő rendszerrel a Smad3 szintjén lép kölcsönhatásba [17]. Napjainkra az is ismertté vált, hogy számos átkapcsolódás van a Smad-mediált TGF- β jelátviteli rendszer és a RAS foszforilációs útvonal között. Ez vezet például az AP-1 komplexek aktiválásához, melyek egyik legfőbb összetevője a JunD, és lehetséges komponense a menin (GTP-áz aktivitása révén).

A Pem fehérjéről csekély információval rendelkezünk, de a meninhez történő direkt kapcsolódását kimutatták [21]. A Pem egy homeobox-fehérje, amely elsősorban a herében expresszálódik és feltehetően transzkripciót szabályozó szereppel bír.

Bár a menin alapvetően nukleáris lokalizációjú fehérje, több munkacsoport beszámolt a menin citoplazmában való szekvesztrációjáról [22–24]. Kimutatták, hogy a GFAP (gliális fibrilláris savas protein) az intermedier filamentum (IF) része, melyben a vimentin az egyik fő alkotóelem. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatokkal bizonyították a vimentin és a menin direkt kapcsolódását, ezért a meninnek a citoplazma IF hálózattal való kölcsönhatása és a menin citoplazmatikus szekvesztrációja is valószínűsíthető. Szintén a GFAP-tartalmú IF hálózattal és ezáltal indirekt módon a meninnel is kapcsolatot létesít az Nm23 metasztázis szuppresszor fehérje, amely egyben lehetővé teszi a menin számára a GTP hidrolízisét azáltal, hogy a menint Ras-közeli GTP-ázokhoz (mint pl. a Rad) köti [25].

Ezek a kapcsolatokon kívül a menin számos transzkripciós faktorról és fehérjéről alakít ki kölcsönhatást. A DNS-repairben résztvevő fehérjék közül, pl. az RPA [26] és a FancD2 [27] direkt módon befolyásolja a ciklin dependens kinázok expresszióját [28]. Továbbá a menin kettősszállú DNS-hez való közvetlen kötődését is kimutatták [29]. Ezek a kölcsönhatásokon keresztül a meninnek szerepet tulajdonítanak a sejt-növekedés [30], illetve sejt-ciklus szabályozásában [31,32], valamint a genom stabilitásában [20,33] (2. ábra).



2. ábra: A menin fehérje feltételezhető szerepe és más fehérjékkel való kölcsönhatásai [20]. Az ábrán szereplő kérdőjel a hatások egyértelműségére utaló bizonyítékok hiányára utalnak.

A menin *in vivo* funkciójával kapcsolatban is számos új funkcióra derült fény. Hendy és mtsai. MEN1-asszociált tumorokban kimutatták, hogy agyalapi mirigy sejtekben a menin inaktivációja gátolta a TGF- β és aktivin jelátvitelt és antagonizálta azok növekedés-gátló hatását. A menin szerepét mutatták ki a prolaktin expresszió aktivin-indukálta gátlásában is; ebben a szabályozó mechanizmusban a Smad fehérjékkel és a Pit-1 transzkripciós faktorral való együttműködés tűnt jelentősnek. A menin inaktivációja mellékpajzsmirigy sejtekben megszüntette a proliferációt és a PTH-szekréción gátló TGF β hatást. Kimutatták azt is, hogy MEN 1 szindrómás betegek mellékpajzsmirigy sejtjeiben a TGF β nem képes a sejtek proliferációjának és PTH-szekréciónak szabályozására. MEN1-hiányos egerek magzataiban cranialis/facialis hypoplasziát észleltek, ami a menin csontfejlődésben betöltött szerepét is felveti. A menin fizikailag és funkcionálisan is kapcsolatban áll a BMP-2 (csont morfogenetikus fehérje-2) szabályozása alatt álló Smad fehérjékkel (pl. Smad 1 és Smad5) és az osteoblast kulcsszabályozó Runx2 fehérjével is. Ezeknek az interakcióknak a hatásai megszűnnek, amint az osteoblastok tovább differenciálódnak. Ekkor a menin a Smad3 fehérjével lép kapcsolatba, ami a Runx2 fehérje TGF β által történő negatív szabályozásához vezet. A menin fehérje a JunD fehérje differenciálódást serkentő hatásainak gátlása révén is gátolja az osteoblast érést [34,35].

II.1.2. Multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa (MEN2)

II.1.2.1. Definíció, klinikai megjelenés

A multiplex endokrin neoplasia 2-es típusában (MEN2) a leggyakoribb daganat a medulláris pajzsmirigyrák, ami mutáció-hordozó betegekben a 40 éves életkor eléréséig csaknem minden esetben kialakul. Phaeochromocytoma a MEN2 szindrómás betegek mintegy felében, míg elsődleges hyperparathyreosis a betegek 10-20%-ában fordul elő. A klinikai tünetek alapján a MEN2 szindróma három altípusra osztható: MEN2A-ban a három elváltozás különböző kombinációkban fordul elő, a MEN2B-ben a mellékpajzsmirigyek nem érintettek, de az MTC és phaeochromocytoma mellett jellegzetes testalkat, marfanoid habitus, csontrendszeri rendellenességek, nyálkahártya neuromák, cornea idegek megvastagodása és pubertás tarda figyelhető meg. A MEN2 szindróma harmadik alcsoportját az MTC önállóan megjelenő formája, az ún. familiáris medulláris pajzsmirigy carcinoma (FMTC) képezi. Ebben az alcsoportban semmilyen más MEN2-re jellemző elváltozás nem mutatható ki [36].

Irodalmi adatok alapján a MEN2 tumorok közül első manifesztációként az esetek 40 %-ában az MTC, kb. negyedében a *phaeochromocytoma* (*Phaeo*), 30 %-ában a kettő együtt jelentkezik. A különböző tumorok megjelenése egy családon belül is nagyon változatos lehet, előfordulhat, hogy a mutáns gént hordozóban a betegség még 80 éves korban sem alakult ki. Általánosságban elmondható, hogy a MEN2 szindrómához társuló MTC jelenik meg a legfiatalabb életkorban, általában 30-40 éves korban, de a biokémiai vizsgálatok (szérum calcitonin) már korábban pozitívak lehetnek. MEN2B-ben az MTC még korábban, nem ritkán az első életévben manifesztálódik [37,38].

Az összes medulláris pajzsmirigy carcinoma mintegy 20 %-a társul MEN2 szindrómához. Általában fájdalommentes féloldali göbként jelentkezik, de az esetek felében ilyenkor már nyaki nyirokcsomó illetve távoli áttéttel rendelkezik. A nyirokcsomókon kívül áttétet leggyakrabban a tüdőbe, csontokba és májba ad. Invazív terjedésre utalhat a rekedtség (nervus recurrens bénulás miatt), a nyelés nehezítettsége és a nyaki fájdalom. A laboratóriumi diagnosztika során a szérum calcitonin szint jelent segítséget. Ez a paraméter már a C-sejt hyperplasiát is megbízhatóan jelzi, de aspecifikusan emelkedett szérum calcitonin szint is előfordulhat. MTC-s betegekben a szérum calcitonin koncentrációk a normális értékek 20-1000-szeresére emelkedhetnek. Az MTC diagnosztikájában a vékonytű aspirációs citológiai vizsgálat alapvető jelentőségű. A képalkotó módszerek közül a CT, MRI és UH vizsgálat a daganat lokalizálására, illetve nyirokcsomó érintettség igazolására alkalmas.

A *Phaeo* a mellékvesevelő chromaffin-sejtjeinek daganata, melynek gyakorisága a hypertóniás betegek között 1 %-os. Az összes mellékvese daganat mintegy 8-10 %-át képezi. A klinikai tünetek általában jellegzetesek és specifikusak, de néha tünetmentes esetek is előfordulhatnak. Jellegzetes klinikai tünetei a fejfájás, izzadás, palpitáció, remegés, szédülés, szorongás és idegesség. A betegek jelentős részében magas vérnyomás igazolható, ami lehet állandó vagy rohamokban jelentkező. Jellemző a vérnyomás nagyfokú ingadozása, valamint az, hogy a szokványos antihypertenzív kezeléssel a magasvérnyomás nehezen befolyásolható. A tüneteket a daganat catekolamin elválasztása és ezek hatásai okozzák. A plazma emelkedett catekolamin tartalma vazokonstrikciót és plazmatérfogat csökkenést okoz. A betegség szövődményeit egyrészt a hipertónia okozza, de a daganat malignus elfajulása is járhat súlyos komplikációkkal. A hipertónia szív- és érrendszeri szövődményekkel (agyi iszkémia, miokardialis infarktus, vérzés) és akár hirtelen halállal is járhat. A *Phaeo* mintegy 10 %-a rosszindulatú és szintén 10 %-a kétoldali. A MEN2 szindrómához társuló *phaeochromocytomákra* jellemző, hogy fiatalabb életkorban jelentkeznek, szűrővizsgálattal még a manifeszt klinikai tünetek megjelenése előtt kiszűrhetők, ritkán malignusak (az esetek kevesebb, mint 10 %-ában), ritkán fordulnak elő a mellékvesén kívül,

de gyakran kétoldaliak és a műtét után gyakrabban újulnak ki [39–41]. Kezelése minden esetben a daganat műtéttel történő eltávolítása, előzetes alfa-adrenerg receptor blokkoló kezelés után.

A mellékpajzsmirigy adenóma esetén a klinikai tünetek néha szegényesek, akár tünetmentes hiperkalcémia is előfordulhat. Fáradtság, gyengeség, polyuria, polidipszia, hányinger, hányás, exsiccosis, vesekövesség, osteitis fibrosa cystica, súlyos esetben idegrendszeri tünetek alakulnak ki. A MEN2B szindrómaához társuló hiperparatireózis (HPT) súlyosabb és agresszívebb lefolyású, mint a MEN2A szindrómával összefüggő hiperparatireózis [38].

A MEN2 szindróma potenciálisan letális betegség, halálhoz leggyakrabban az MTC vezet. A genetikai szűrővizsgálat jelentőségét alátámasztja az a megfigyelés, hogy ha a betegnek a diagnózis megállapításakor már manifeszt tünetei vannak, akkor a MEN2-vel összefüggő mortalitás 35 %-os, ha a diagnóziskor klinikai tünet még nincs, de a laboratóriumi tesztek már pozitívak akkor 10 %-os, míg a genetikai vizsgálat birtokában elvégzett preventív thyreoidectomia esetén a MEN2-vel összefüggő mortalitás gyakorlatilag 0 %-ra csökken [2,42].

4. táblázat: A MEN2 szindróma alcsoportjai

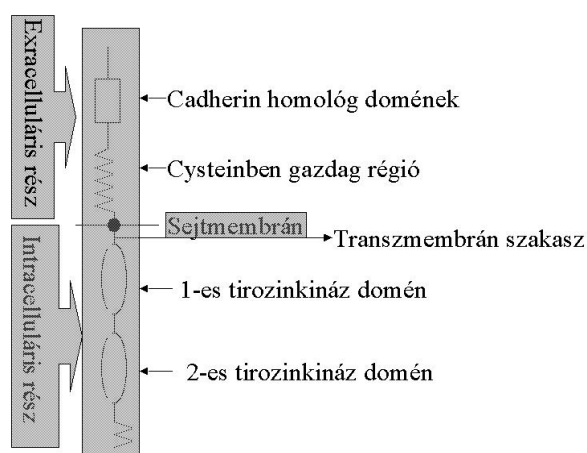
Alcsoport	Klinikai manifesztációk
MEN2A	Medulláris pajzsmirigy-karcinoma Phaeochromocytoma Hyperparathyreosis (mellékpajzsmirigy-adenoma)
FMTc	Medulláris pajzsmirigy-karcinoma
FMTc vagy MEN2A + Hirschsprung FMTc + cutan lichen amyloidosis	FMTc vagy MEN2A + Hirschsprung-betegség FMTc + viszkető bőrleváltozások a háton
MEN2B	Medulláris pajzsmirigy-karcinoma Phaeochromocytoma Nyálkakártya neuómák Intesztinális ganglioneuromatosis Marfanoid alkat

FMTc = familiáris medulláris pajzsmirigy carcinoma

II.1.2.2. A MEN 2 szindróma genetikai háttere - RET protoonkogén

A MEN 2 szindróma autoszomális domináns módon öröklődő kórkép, melynek kialakulásáért a RET protoonkogén csírasejtes mutációi felelősek. A RET protoonkogént Takahashi és mts. fedezték fel egy transzfekciós kísérlet során 1985-ben [43,44]. A transzfekció során azonosítottak egy egyszálú DNS-t, ami a transzfekció során rekombinálódott. A DNS-en két különböző génszekvenciát mutattak ki, melyeket RFP-nek (RET-fused) és RET-nek (rearranged during transfection) neveztek el. A gén lokalizációját a 10q11.2 lókuszon 1994-ben Mulligan és Gardner munkacsoportjai tisztázták [45]. A RET gén 55 kb nagyságú és 22 exonból áll. A fehérje egy receptor tirozin kináz TGFβ szupercsaládba tartozó transzmembrán fehérje, melynek

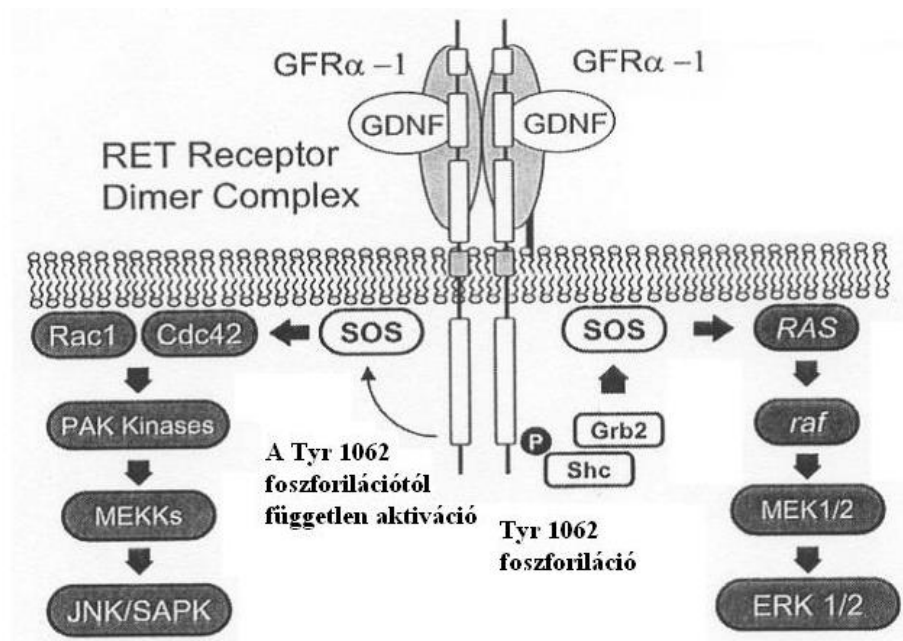
molekulasúlya a glikoziláltságtól függően 150 illetve 170 kD [46]. Az extracelluláris rész tartalmazza a cadherin-kötő doméneket, melynek a jel-átvitelben van jelentősége, valamint az ún. ciszteinben gazdag régiót, melynek a receptor dimerizációban van szerepe (**2. ábra**).



3. ábra A RET receptor szerkezete

A RET fehérje fiziológias funkciója az idegdúc eredetű sejtek fejlődésének és ezek migrációjának a szabályozása. A RET fehérje expresszióját igazolták az idegdúc eredetű sejtekben, a pajzsmirigy C sejtekben, a mellékvesevelőben, a paraszimpatikus és szimpatikus ganglionokban, a bél- és az urogenitális rendszer ganglionjaiban és kimutatták jelenlétét a mellékpajzsmirigy sejtekben is. Kimutatták, hogy a *RET* protoonkogén kiütése vese agénézist és a gyomor-bél rendszer beidegzésének károsodását, valamint Hirschprung betegséget okoz [47–49].

A RET receptor ismert ligandjai a következők: gliasejt eredetű növekedési faktor (GDNF), neurturin (NTN), artemin és persephin [50,51]. A GDNF egy neurotróf anyag; a középagy dopaminerg neuronjainak fennmaradásában, az autonóm idegsejtek, kisagyi Purkinje sejtek, motoneuronok túlélésében játszik szerepet. A GDNF a jelátvitelt a RET aktiválásán keresztül indítja be [52]. A koreceptorok a ligandkötésért, a RET pedig a jelátvitelért felelős. A ligandok dimerizálódáson keresztül a receptort aktiválják, majd a RET fehérje intracelluláris részén lévő tirozin foszforilálódik, ami különböző összekötő fehérjéket indukál (Shc és Grb2). Ezek az összekötő fehérjék a RET molekulával együtt a Sos, Ras és Raf-1 molekulákat aktiválják, melyek a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) utat indítják el. Irodalmi adatok alapján a RET a c-Jun (JNK), foszfolipáz C és foszfatidilinozitol 3-kinázokon keresztül is hathat (**3. ábra**) [53,54].

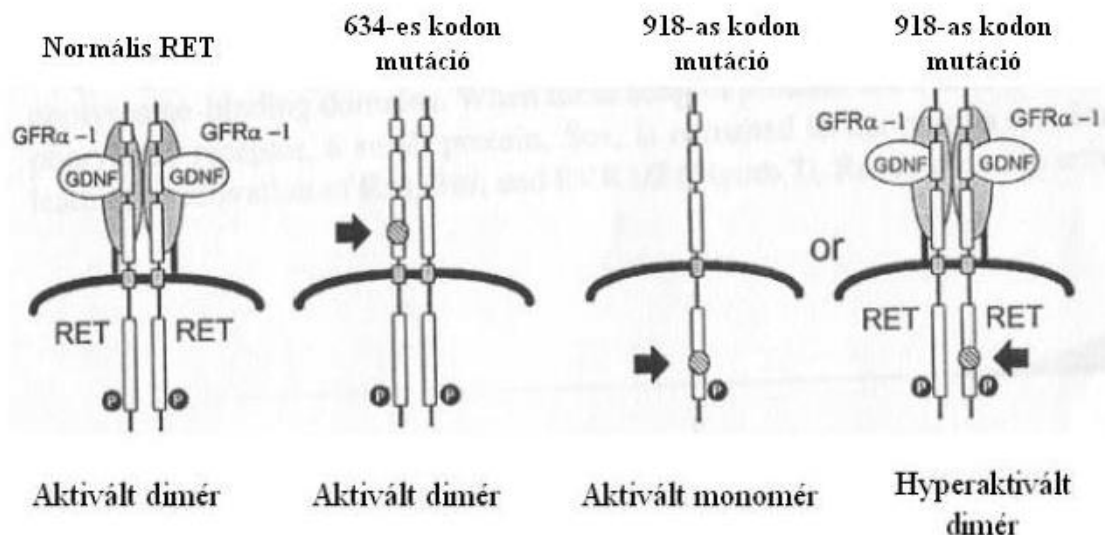


4. ábra A RET receptor jelátviteli útja.

A *RET* gén mutációkat két nagy csoportba osztjuk; az első csoportba tartozók a *RET* inaktiválódását okozzák és a Hirschprung betegség pathogenesisében játszanak szerepet, míg a második csoportba tartozók a *RET* ligand nélküli aktiválódását váltják ki. Utóbbi csoportba sorolt ún. aktiváló mutációk játszanak szerepet a MEN2 tumorok pathogenesisében.

A MEN2 szindrómáért a *RET* protoonkogén *aktiváló mutációi* felelősek. Ezek a mutációk az extracelluláris ciszteinben gazdag régió mutációi a RET receptor aktivációját okozzák. A 634-es kodon mutációk a RET ligand nélküli homodimerizációját és következményes tirozin kináz aktiválódását eredményezik. A ciszteinben gazdag régiót érintő mutációk ezt a hatást a páratlan ciszteinek között kialakuló diszulfid hidakon keresztül váltják ki.

A tirozinkináz doméneket érintő mutációk két úton okozhatnak receptor aktiválódást. Első lépésben a RET autofoszforylációja lép fel, ami egy aktív monomert eredményez, majd dimér jöhet létre a normális vagy mutáns receptorral, de mindkét esetben a receptor-dimér hyperreaktív állapotba kerül (4. ábra).



5. ábra: Receptor dimerizáció normális RET, valamint RET 634-es és 918-as kodon mutációk esetén.

Irodalmi adatok alapján az összes MEN2 szindrómás beteg 90-95 %-ában mutatható ki *RET* mutáció [54,55]. A mutációk predilekciós helyeinek vizsgálata helyett a *RET* gén MEN2 szindrómát okozó exonjának nukleotid szekvencia analízisével azonban a MEN2 szindrómás esetek akár 98-100 %-ában igazolható mutáció [56]. A ciszteinben gazdag régióban (10-es és 11-es exonok) előforduló aktiváló mutációk a MEN2A és FMTC kb. 95%-áért felelősek. Az 5. táblázatban aláhúzással jelöltem meg a 634-es kodont, melynek mutációi okozzák az irodalmi adatok szerint a MEN2 szindrómás esetek mintegy 80-90 %-át [2,37,45,57,58].

A 10-es exon mutációk (609, 611, 618, 620 kodonok) elsősorban inkomplett MEN2A szindrómával járnak együtt. MTC minden esetben, phaeochromocytoma ritkán (609-es kodon mutáció esetén az irodalmi adatok szerint egyáltalán nem) míg hiperparatizérozis gyakran kialakul. A 618-as és 620-as kodonok mutációit igazolták MEN2A és Hirschprung betegség együttes előfordulásakor [59].

A 11-es exonon a 634-es kodon mutációk többsége MEN2A szindrómával társul (az 1994 évi V. International MEN Workshop felmérése alapján, ami 361 MEN2A szindrómás család adatait tartalmazta, a 634-es kodon mutáció az esetek 87,1 %-ában fordult elő). A 634-es kodon mutációk azonban nem ritkán (az esetek 30 %-ában) FMTC-ben szenvedő betegekben is előfordulhatnak [57]. A 634-es kodon mutációját mutatták ki MEN2A szindróma és cutan lichen amyloidosis együttes előfordulásakor is [59].

A 13-as és 14-es exonok mutációi leggyakrabban FMTC-val társulnak, de a 13-as exon 790-es kodon és a 14-es exon 804-es kodon mutációi esetén komplett MEN2A szindróma kifejlődéséről

is beszámoltak [57,58,60,61]. Összeségében megállapítható, hogy a 13-as és 14-es exonok mutációi viszonylag ritkák, az összes MEN 2 szindrómás beteg mindössze 1-2 %-áért felelősek és klinikailag enyhébb fenotípus kifejlődését okozzák.

MEN2B szindrómás betegek 94-95 %-ában igazoltak RET mutációt, ami leggyakrabban (az esetek több mint 95 %-ában) a 16-os exonon a 918-as kodont érintette. Ritkán a 16-os exon 922-es kodon és a 15-ös exon 883-as kodon mutációi is társulhatnak MEN 2B szindrómával [37,38,62]. Klinikai megfigyelések szerint ezek a mutációk súlyosabb, agresszívebb tumorok kialakulását eredményezik.

Sporadikus előfordulású MTC esetek 15-25 %-ban igazoltak szomatikus RET mutációt (918-as, 768-as és 883-as kodonok) [37,38,60,63].

5. táblázat Genotípus-fenotípus összefüggések MEN 2A, MEN 2B szindrómában és FMTC-ben, valamint a RET mutációk relatív gyakorisága

			MEN 2A	FMTC	MEN 2B	Százalékos gyakoriság
Exon 10	609-es kodon: Cys-Tyr	Cys-Ser	.	*		0-1
		Cys-Phe	*	*		
	611-es kodon: Cys-Tyr	Cys-Phe	*	*		2-3
Exon 11		Cys-Trp	*	.	.	
		Cys-Ser	*	*	.	
	618-as kodon: Cys-Tyr	Cys-Gly	*	*	*	3-5
Exon 12		Cys-Trp	*	*	.	
		Cys-Phe	*	*	.	
	620-as kodon: Cys-Tyr	Cys-Ser	*	.	*	6-8
Exon 13		Cys-Arg	.	.	*	
	630-as kodon: Cys-Phe	Cys-Tyr	*	.	*	<0,1
	634-es kodon: Cys-Tyr	Cys-Trp	*	*	.	80-90
Exon 14		Cys-Ser	*	*	.	
		Cys-Arg	*	*	.	
	769-es kodon: Glu-Asp		.	*		0-1
Exon 15	790-es kodon: Leu-Phe		*	*		<0,1
	791-es kodon: Tyr-Phe		.	*		<0,1
	804-es kodon: Val-Leu		*	*		0-1
Exon 16		Val-Met	*	*		
	844-es kodon: Arg-Leu		.	*		<0,1
	883-as kodon: Ala-Phe		.	.	*	<0,1
Exon 16	891-es kodon: Ser-Ala		.	*		<0,1
	918-as kodon: Met-Thr		.	.	*	10-20
	922-es kodon: Ser-Tyr		.	.	*	<0,1

Klinikánkon a *RET* protoonkogén molekuláris genetikai vizsgálatát 1997-ban, PhD munkám kezdetén vezettük be. Ez volt az első olyan genetikai vizsgálat, amelynek bevezetésével a Klinika felzárkózott azon centrumok sorába, amelyek elsők között nyújtottak teljes körű diagnosztikai szolgáltatást a betegségben szenvedők és vérrokon családtagjaik számára. A *RET* protoonkogén mutáció vizsgálata az érintett betegekben és a vérrokon családtagokban a MEN2 szindróma diagnózisán kívül a betegség prognózisának a megítélésében is jelentős szereppel bír.

6. táblázat: A *RET* genotípus és a klinikai fenotípus összefüggései, a génmutációk gyakorisága, a medulláris pajzsmirigy-carcinoma várható kórlefolyása és a preventív thyreoidectomia javasolt időpontja MEN2 szindrómában

Exon	Kodon	MEN2A/ FMTTC	MEN2B	Gyakoriság	MTC kórlefolyás	Preventív thyreoidectomia**
10	609, 611, 618, 620	igen	nem	10-17	súlyos	5 éves életkor előtt
11	630, 634	igen	nem	80-90	súlyos	5 éves életkor előtt
13	769, 790, 791	igen	nem	< 1	kevésbé súlyos	5–10 éves életkor
14	804*	igen	nem	1-3	kevésbé súlyos	5–10 éves életkor
15	844*, 891*	igen	nem	< 1	kevésbé súlyos	5–10 éves életkor
	883	nem	igen	< 1	agresszív, legsúlyosabb	6 hónapos életkor előtt
16	918, 922	nem	igen	10-20	agresszív, legsúlyosabb	6 hónapos életkor előtt

*: phaeochromocytoma és hiperparatireózis ritka

** egyes ajánlások szerint a thyreoidectomia későbbi időpontra halasztható azokban az esetekben, amelyekben a *Ret* genotípus alapján a medulláris pajzsmirigy-carcinoma kevésbé súlyos kórlefolyása várható

Ezek az adatok is alátámasztják, hogy a MEN2 szindróma ritka előfordulása miatt a genotípus és a klinikai fenotípus között összefüggések feltárásához minél több klinikai és genetikai adat szükséges, amihez az ilyen betegekkel foglalkozó centrumok együttműködésén keresztül valósulhat meg. Kutatásaim során több olyan konzorcium munkájában is résztvettem, amelyek az örökletes endokrin tumorok vizsgálatát tűzte ki célul. Ezeken belül is a MEN2 és a phaeochromocytómák/paragangliómák területén olyan új összefüggéseket sikerült igazolni, amelyek napjainkban már a szakmai ajánlások részeivé váltak.

II.1.3. Von Hippel-Lindau szindróma

II.1.3.1. Definíció, klinikai megjelenés

A von Hippel-Lindau-szindróma (VHL-szindróma) egy összetett endokrin- szemészeti-neurológiai- urológiai tumorszindróma. Prevalenciája 1: 36.000-53.000 közöttire tehető [64,65]. A VHL-szindrómában a retina, a kisagy, a gerincvelő területén gyakran, míg ritkán a hasnyálmirigy, a vese, a tüdő, a máj, és a mellékvese területén haemangiómák/haemangioblastomák alakulnak ki [66,67]. További manifesztációk közé tartozik a világossejtes veserák, a phaeochromocytoma, az endolymphatikus zsák tumora, multiplex vese, mellékhere, hasnyálmirigy ciszták is. A mellékhere, valamint a széles méhszalag cystadenoma és a hasnyálmirigy neuroendokrin daganata ritka komponense a VHL-szindrómának [66,68]. A VHL-szindrómát két fő altípusra osztják fel a Phaeo alapján. Az 1-es típusban a Phaeo igen alacsony valószínűséggel fordul elő és többi manifesztáció

mind kialakulhat, míg a 2-es típus fő komponense a Phaeo. A 2A típusban a világossejtes veserák kockázata alacsony, míg a 2B típusban magas. A 2C egy önálló entitás, melyben a Phaeox egyéb más kísérőelem nélkül jelenik meg [69].

7. Táblázat: A VHL-szindróma klinikai típusai

VHL-1	Retina haemangioblastoma
	Központi idegrendszeri haemangioblastoma
	Világossejtes veserák
	Pancreas tumor/ciszta
VHL-2A	Phaeochromocytoma
	Retina haemangioblastoma
	Központi idegrendszeri haemangioblastoma
VHL-2B	Phaeochromocytoma
	Retina haemangioblastoma
	Központi idegrendszeri haemangioblastoma
	Világossejtes veserák
	(Pancreas tumor/ciszta)
VHL-2C	Phaeochromocytoma
	(„Phaeochromocytoma -only”, „LSP)

A VHL-szindróma manifesztálódása átlagosan a 4. évtizedre tehető, de a szórás igen nagy (1-78 év), ugyanakkor a betegség penetranciája csak 65 éves korra válik 100 százalékosra. Ennek alapján az újabb manifesztációk jelentkezése esetén a beteg/család reklassifikációja válhat szükségessé [69].

Hasonlóan a MEN1 és MEN2 szindrómákhoz a VHL szindrómában is a mutációt hordozókban célzott diagnosztikai és terápiás beavatkozások elvégzése indokoltak (**8. Táblázat**).

8. Táblázat: Von Hippel–Lindau-szindrómához társuló daganatok szűrésére javasolt program*

Vizsgálat	Javasolt életkor
Fizikális vizsgálat	2 éves kortól évente
Ophthalmoscopy	újszülöttkortól évente
Fluoreszcens angiográfia	csak indokolt esetben
Vizelet/vér katecholamin	2 éves kortól évente
Hasi ultrahang	11 éves kortól évente
Hasi CT	20 éves kortól 1-2 évente
Hasi MRI (MIBG)	csak indokolt esetben
Koponya-MRI (gadolinium kontrasztanyag)	11 éves kortól két évente
Hallásvizsgálat	tinnitus és vertigo esetén

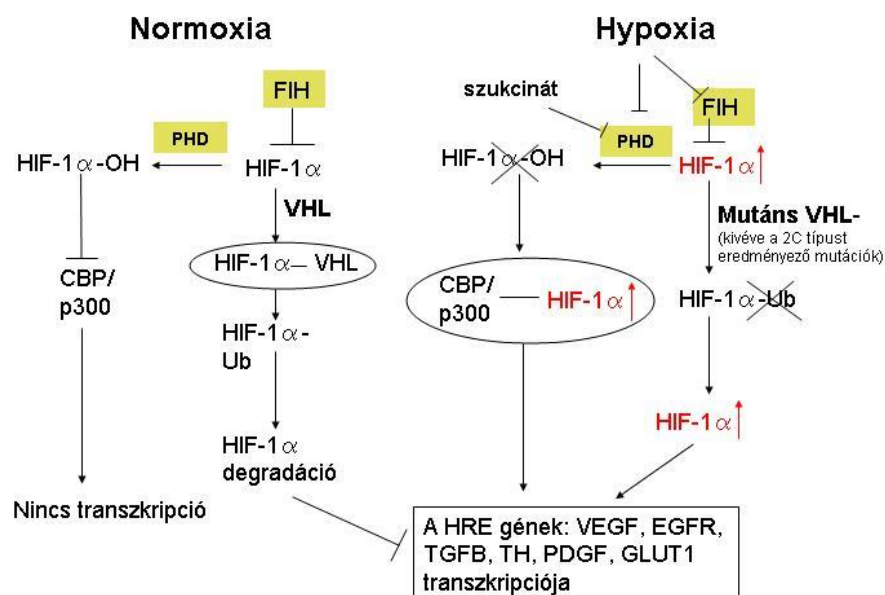
* National Institute of Health ajánlása alapján

II.1.3.2. VHL génmutációkhoz társuló pathomechanizmus

A VHL gén evolúciós szempontból igen konzervatív, jelentős a homológia a humán a kutya, az egér és a patkány gének között [66,70,71]. A mutációk autoszomális domináns öröklésmenettel öröklődnek. A gén a 3. kromoszóma rövid karján a 3p25-26 régióban található [66]. A mutációk a

Knudson-féle kettős sérülés hipotézis alapján okoznak daganatképződést, azaz az egyik mutáció megtalálható a csírasejt egyik allélján, míg a második mutáció pedig már szomatikusan alakul ki. A *VHL* gén 3 exonból álló gén 2 splicing variánssal rendelkezik, melyek átíródva képezik a pVHL19 és pVHL30 fehérjéket (a szám a molekulásúlyt jelenti kilodaltonban). Az alternatív splicing hely a hosszabb variáns 55.kodonjánál található, tehát a teljes, 213 aminosavból álló pVHL30 helyett egy csak 159 aminosavból álló pVHL19 fehérje íródik át [72]. Mindkét VHL fehérjében két funkcionális domén, egy α - és egy β -domén található [70,73,74]. A kisebb α -domén (155-192. aminosav) három alfa-hélixből áll (H1, H2, H3), míg a nagyobb β -domén (63-154. és 193-204. aminosav) egy hét redőből álló béta-redő és egy alfa-hélix (H4). A VHL fehérjében két funkcionális jelentőséggel rendelkező hely található. Az egyik az α -doménban az elongin C kötőhely (157-170. aminosav), míg a másik a β -doménban a HIF1 α (hypoxia indukálta faktor)-kötőhely (91-113. aminosav) [72]. A betegségokozó mutációk többsége ezen két kötőhely területén található. A VHL mutációkhoz társult mechanizmus a HIF1 α stabilizálódásához, majd a HRE gének fokozott transzkripciójához [75]. Normoxiában a és ép VHL esetén a HIF1 α lebomlik, míg hipoxiában vagy károsodott/hiányzó VHL esetében stabil marad (**6. ábra**).

Összesen több mint 800 különböző mutáció ismert a *VHL* gén mutációs adatbázis (www.umd.be/ vhl) alapján. Bár ismertek genotípus-fenotípus összefüggések a legtöbb VHL-szindrómás család egyéni fenotípust mutat. A VHL-szindróma 1-es típusában jellemzően a fehérje hidrofób magját érintő misszensz és nonszensz mutációk, illetve deléciók fordulnak elő, melyek súlyosan károsodott, megrövidült fehérjéhez vezetnek, ezáltal teljes funkcióvesztést okoznak. Ezzel szemben a VHL-szindróma 2-es típusában a misszensze típusú mutációk inkább a fehérjekötő helyeket érintik ezáltal részleges funkciókiesést okoznak. Mindeztől az alternatív start kodonként szereplő 55. kodon előtti lokalizációban (25, 38, 46, 52. kodonok) csak néhány mutációt igazoltak, melyek phaeochromocytoma (25, 38), illetve VHL-szindróma (E46X és E52K) esetén fordulnak elő [76–79].



6. Ábra: Az ún. pseudohypoxia mechanizmus, mutáns vagy hiányzó VHL fehérje esetén. Normoxiában a HIF-1α VHL kötődést követően ubikvinálás útján degradálódik, vagy a PHD enzim részén hidroxilálódik, így a HIF-1α transzkripciós aktivitása kiesik. Mutáns VHL, vagy a felhalmozódó szukcinát következtében a HIF-1α stabilizálódik és mint transzkripciós faktor kötődik a gének promóterében található HRE szekvenciákhoz, serkentve a HRE gének transzkripcióját. (PHD: prolyl hidroxiláz; FIH: factor inhibiting HIF; VHL: von Hippel-Lindau fehérje; HIF-1α: hypoxia indukálabilis faktor; HRE: hypoxia reszponzív element; VEGF: vaszkuláris endothél növekedéso faktor; EGFR: epidermalis növekedési faktor receptor, TGFB: transforming növekedési faktor béta, TH: tirozin hidroxiláz; PDGF: trombocita növekedési faktor; GLUT1: glukóz transzporter 1-es típus; CBP/p300: ciklikus CREB kötő fehérje és p300 fehérjék).

II.1.4. Neurofibromatózis 1-es típusa

A neurofibromatózis 1-es típusát (von Recklinghausen-betegség) a bőrön kialakuló neurofibromák és pigmentált, „tejeskávészerű” foltok, iris hamartomák (Lisch-csomók) jellemzik. A betegséghez nervus opticus glioma, pheochromocytoma, karcinoid tumor és gasztrointesztinális stromalis tumor társulhat. A leggyakoribb autoszomális dominánsan öröklődő betegség, gyakorisága 1: 3500. Az esetek mintegy fele sporadikusan fordul elő, amit a betegségért felelős *NF1* tumorszuppresszor gén nagy mutációs hajlama magyaráz. Az *NF1* gén a 17. kromoszómán található (17q11.2), a gén által kódolt fehérje a ras onkogén szabályozásában vesz részt. Neurofibromatosis 1-es típusában szenvedő betegek mintegy 5%-ában fordul elő pheochromocytoma, azonban hypertóniás *NF1* betegekben a pheochromocytoma gyakorisága akár az 50%-ot is elérheti.

II.1.5. Örökletes phaeochromocytóma/paraganglioma szindrómák

Paragangliomák (PGL) intraabdominalisan, intrathoracalisan vagy a fej-nyak régióban fordulnak elő. Az örökletes esetek gyakorisága különböző populációkban eltérő, az összes eset 10-50%-át teszik ki [80,81]. Klinikai tüneteik változatosak, a fej-nyak paragangliomák általában hormonálisan inaktív daganatok, leggyakrabban a kompressziós tünetek hívják fel rájuk a figyelmet. Az intraabdominális és intrathoracalis paragangliomák katecholaminokat termelhetnek és a Phaeo-hoz hasonló tüneteket okozhatnak.

A familiaris megjelenésű PGL-k 50-70%-ában a sejtmagban kódolt *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* gének csírasejtes mutációit lehet igazolni. Az *SDH* gének a szukcinát dehidrogenáz enzim alegységeit kódolják. A családi halmozódást mutató eseteken kívül a látszólag sporadikus esetek 25-30%-ában mutatható ki valamelyik *SDH* gén eltérése. A csírasejtes mutációk típusai különbözőek; az *SDHB* és *SDHC* géneken kb. egyenlő arányban fordul elő csonkolt fehérjét eredményező és misszensz mutáció, míg az *SDHD* génen gyakoribb a csonkolt fehérjét okozó mutáció.

Az *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* géneken kívül az elmúlt 8 évben további 8 gén betegség-okozó mutációit azonosították örökletes paraganglioma szindrómákban (*SDHA*, *SDHAF2*, *FH*, *KIF1B*, *PHD2*, *MAX*, *TMEM127* és *MDH2* gén mutációk). A lehetséges betegség-okozó gének nagy száma jelentősen megnövelheti a genetikai vizsgálatok költségét és munkaidő igényét, ezért elengedhetetlen az egyes gének vizsgálatának racionális megtervezése. Az Amerikai Endokrin Társaság fenotípus-orientált algoritmust dolgozott ki a genetikai vizsgálatok sorrendjére [81]. Ennek értelmében a MEN2 és a VHL szindróma kizárása után a következő feladat az *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* gének vizsgálata. Az utóbbi 3 gén vizsgálatának sorrendjét illetően a klinikai fenotípus jelenthet segítséget (pl. *SDHC* gén mutációt napjainkig csak fej-nyak paragangliomában szenvedő betegekben mutattak ki; malignus paragangliomában szenvedő betegben elsőként az *SDHB* gén vizsgálata javasolt) [81].

9. táblázat. Örökletes phaeochromocytómák és paragangliómák háttérében álló gének és felfedezésük éve

Szindróma	Gén	Azonosítás éve
Neurofibromatosis 1-es típus	NF1	1990
vonHippel-Lindau	VHL	1993
MEN2	RET	1994
PGL1	SDHD	2000
PGL4	SDHB	2000
PGL3	SDHC	2001
Pheo, neuroblastoma, tüdő cc.	KIF1Bbeta	2008
Paraganglioma, erythrocytosis	PHD2	2008
PGL2	SDHAF2	2010
Pheo, paraganglioma	TMEM127	2010
Pheo, paraganglioma	SDHA	2011
Pheo, paraganglioma	MAX	2011
Pheo	FH	2014
Pheo	MDH2	2015

PGL: paraganglióma

Örökletes paraganglioma szindrómákban nagyszámú genotípus-fenotípus összefüggés ismert. *SDHD* gén mutációk esetén azonos gyakorisággal fordul elő intraabdominális és fej-nyak paraganglioma, míg *SDHC* gén mutációkat napjainkig csak fej-nyak paragangliomában szenvedő betegekben mutattak ki [82]. Különösen rossz prognózissal járnak az *SDHB* gén mutációi a betegségben gyakori malignus paraganglioma miatt.

Az *SDH* gén mutációk és daganatképződés mechanizmusa még nem egyértelműen tisztázott. Valószínű, hogy a patomechanizmusban fontos szerepe van a szukcinát dehidrogenáz enzim csökkent működése miatt felszaporodó szukcinátnak, ami a sejtek citoplazmájában gátolja a prolil-hidroxiláz enzim működését. Ennek következményeként a hypoxia indukálható faktor 1-es típusa (HIF1) stabilizálódik és megnövekszik a hypoxia szenzitív gének transzkripciója (VEGF, PDGF, GLUT1). Ezt az ún. pseudo-hypoxia mechanizmust igazolták VHL szindrómában kialakuló daganatok hátterében is. Ezt a mechanizmust alátámasztotta az *SDHx* mutációkhoz társult daganatok génexpressziós mintázata, amelyek a VHL mutációkhoz társult daganatokkal rendeződtek egy csoportba, szemben a *RET* és *NF1* asszociált daganatokkal [83].

A pseudo-hypoxia mechanizmuson kívül a reaktív oxigén gyökök fokozott termelése miatt kialakuló DNS károsodás, a kóros mitokondrium funkció által csökkent ATP szintézis és ennek következményeként aktiválódó sejt túlélési útvonal aktiválódás, továbbá az apoptózis zavarának lehetséges patogenetikai szerepe is felmerült [75,83,84].

Újabb eredmények felvetették, hogy a szukcinát, mint intracelluláris onkometabolit több enzim működésének a gátlásában is részt vehet. Ezek bemutatása a dolgozatomban eredményei fejezetben kerül részletezésre.

II.1.6. Csírasejtes *PTEN* mutációkhoz társuló kórképek

II.1.6.1. Cowden kór

A Cowden kór ritka örökletes kórkép (az Amerikai Egyesült Államokban a gyakorisága 1:200.000). A betegség prevalenciájáról hazai adat nem áll rendelkezésre. A felismerést megnehezíti, hogy a klinikai kép rendkívül változatos, számos eltérés önmagában nem kórjelző, és az előtérben álló klinikai tünetektől függően a betegeket különböző szakterületeken kezelik. A klinikai diagnózis felállításához az Amerikai National Comprehensive Cancer Network feltételrendszere nyújt segítséget [85,86] (**10. táblázat**).

10. táblázat A Cowden kór diagnózisához használatos ajánlás

Patológiai elváltozások

- Felnőttkori Lhermitte-Duclos kór (kisagyi daganatok)
- Mucocutan léziók
 - Trichilemmomák (gyakran arcon)
 - Acralis keratozis
 - Papillomatosus papulák

Major eltérések

- Emlőrák
- Pajzsmirigy rák (follikuláris carcinoma)
- Macrocephalia (megalcephalia)
- Endometrium carcinoma

Minor eltérések

- Nem malignus pajzsmirigy eltérések (adenoma, multinoduláris golyva)
- Mentális retardáció ($IQ \leq 75$)
- Emésztőrendszer hamartomák
- Fibrocisztás emlőbetegség
- Lipomák
- Fibromák
- Vese és vizeletvezető rendszer daganatok (leggyakrabban világossejtes veserák)
- Vese és vizeletvezető rendszer malformációk
- Méh fibroidok

A betegség legfontosabb jellemzői: macrocephalia, multiplex hamartomák, bőrijelenségek, valamint rosszindulatú daganatok együttes előfordulása. Mucocutan bőrijelenségek a betegek 90-100%-ában, fibrocisztás emlő elváltozás az esetek 75%-ában, méh fibroidok és vastagbél hamartomatózus polypok az esetek mintegy 40 %-ában észlelhetők. Az endokrin rendszer betegségei közül a pajzsmirigy patológiás elváltozásai az esetek mintegy 50-65%-ában fordulnak elő (ezek többsége follikuláris pajzsmirigyrák). A Cowden kór klinikai diagnózisát támasztja alá, ha legalább 2 major eltérés észlelhető, vagy 1 major eltéréshez legalább 3 minor eltérés társul, vagy ha legalább 4 minor eltérés együttesen fordul elő (**10. táblázat**). Családi halmozódású esetekben akkor állapítható meg a betegség, ha a vizsgált egyénben legalább egy patológiai elváltozás észlelhető, vagy egy major eltérés fordul elő minor eltéréssel vagy anélkül, vagy ha két minor eltérés együttesen van jelen.

A Cowden kór klinikai képéhez hasonló, de azzal nem teljesen megegyező fenotípusú betegekben a Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindróma és a Proteus vagy Proteus-szindróma-szerű kórképeket értik. A Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindróma a Cowden kórhoz hasonló, de annál benignusabb autoszomális dominánsan öröklődő kórkép (BRRS-OMIM 153480). Jellemzői a Cowden kórhoz hasonló fejlődési rendellenességek (macrocephalia, fejlődés elmaradás), hamartomák (lipomatosis, haemangiomatosis) és bőrijelenségek (pl. glans penis pigmentált maculák), azonban a Cowden kórtól eltérően a malignus daganatok kivételesen ritkák. A Proteus és

Proteus-szerű szindrómák heterogén kórképek. Jellemző elváltozások (macrocephalia, lipomatosis, érfejlődési rendellenességek, epidermoid és kötőszövet eredetű naevusok, hemihypertrophia) hasonlítanak a Cowden kórban és Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindrómában észlelt elváltozásokra, de a családi halmozódás ritka [86].

II.1.6.2. Genotípus-fenotípus összefüggések *PTEN* csírasejtes mutációkhoz társuló kórképekben

A Cowden és a fentebb részletezett Cowden-szerű kórképek közös vonása, hogy háttérükben a *PTEN* tumorszuppresszor gén mutáció azonosíthatóak. A *PTEN* gén (vagy *MMAC1* gén vagy *TEP1* gén a 10. kromoszóma hosszú karján, a 10q22-23 lókuszon helyezkedik el és egy 403 aminosavból álló fehérjét kódol, amely tirozin- és lipid-foszfátáz aktivitással rendelkezik [87,88]. A tirozin-foszfátáz működésért egy központi elhelyezkedésű mag régió felelős, míg egy hosszabb, mintegy 175 aminosavból álló szakasz az aktinnal szoros kölcsönhatásban álló fehérjével, a tenzinnel azonos szerkezetű. A gént e két jellegzetesség alapján nevezték el (*PTEN* = phosphatase and tensin homologue; foszfátáz és tenzin homológ). Betegség-okozó mutációk, a gén teljes területén, de leggyakrabban az 5., 7. és 8. exonokban igazolhatóak. A foszfátáz aktivitás szempontjából fontos fehérje-szakaszt az 5. exon kódolja és az összes mutáció csaknem 40%-a ezen az exonon található [89]. A Cowden kór diagnózisára javasolt klinikai feltételrendszer alkalmazása esetén a betegek 80%-ában mutatható ki betegség-okozó csírasejtes *PTEN* gén eltérés [90]. Azokban a vizsgálatokban, amelyekben a Cowden kórra gyanús betegek genetikai vizsgálatát nem a javasolt klinikai feltételrendszerre alapozták, a betegség-okozó genetikai eltérések gyakoriságot 10-50%-osnak találták. Cowden kóros betegekben a *PTEN* gén 5'-végen észlelt mutációk általában súlyosabb klinikai megjelenéssel és több szerv érintettséggel társulnak [91].

Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindrómában a betegség-okozó csírasejtes *PTEN* gén mutációk gyakorisága 60%. Kimutatták, hogy Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindrómás betegekben a *PTEN* gén mutáció jelenléte esetén az emlő daganatok és a lipomatosis lényegesen gyakrabban fordulnak elő, mint azokban a betegekben, akik nem hordoznak mutációt [92]. Míg Cowden kórban és Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindrómában a *PTEN* gén mutációs spektruma megegyezik, Proteus szindrómában a mutációk a foszfátáz domént kódoló gén-szakasz helyett más gén-szakaszokon találhatóak. Klinikailag nagyon fontos megfigyelés, hogy azokban a betegekben, akikben a Cowden kór és a Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindróma lehetősége felmerül, de a klinikai feltételrendszer alapján biztos diagnózis nem állapítható meg (Cowden kórt és Bannayan-Riley-Ruvalcaba szindrómát átfedő kórképek), a *PTEN* gén mutációk gyakoriságát 92 %-osnak találták [91]. Ez arra utal, hogy a klinikai fenotípus egyes összetevőinek penetranciája, akár azonos mutáció esetén is, rendkívül eltérő lehet.

II.2. SPORADIKUS ENDOKRIN DAGANATOK

II.2.1. Mellékvesekéreg-karcinóma

II.2.1.1. Definíció, gyakoriság

A mellékvesekéreg-karcinóma (ACC–adrenocortical cancer) egy, a mellékvese kéregállományából kiinduló ritka, kiemelten rosszindulatú, rossz prognózisú daganat [93]. Incidenciája 0,7-2,0/millió fő/év [93,94]. Leggyakrabban 40-50 éves kor körül manifesztálódik, de brazil populációban relatíve gyakori az öröklött *TP53* mutáció okozta Li-Fraumeni szindrómához társuló gyermekkori ACC is [95]. Prognózisa rossz, az ötéves túlélés csupán 22-37% [96,97]. Az ACC szövettani diagnózisa is nehéz feladat. Az adrenokortikális eredet tisztázását (SF1 fehérje immunhisztokémiai vizsgálata) követően a dignitás megállapítása következik, melynek során a 9 különböző patomorfológiai tényező (köztük pl. nukleáris morfológiai elváltozások, mitózisok száma és típusai, daganat architektúrája, nekrosis jelenléte, tokot ill. véredényeket elérő infiltráció jelenlétének vizsgálatai) összetevőiből álló ún. Weiss score meghatározása mellett a proliferáció immunhisztokémiai markereinek (elsősorban Ki67 index) vizsgálatára kerül sor [93,98]. A Ki67 index meghatározása kiemelt jelentőségű, ugyanis ez számít a legerősebb prognosztikai markernek.

A mellékvesekéreg-karcinóma leggyakrabban sporadikus előfordulású megbetegedés, melynek hátterében a Wnt/ β -katenin útvonal fokozott aktivációja és az emelkedett IGF-2 szignalizáció a két leggyakoribb patogenetikai eltérés [93].

Nagyon ritka örökletes kórképekben pl. Li-Fraumeni, Beckwith-Wiedemann és familiáris adenomatózus polipózis szindrómákban megfigyelhető kialakulása. A Li-Fraumeni szindróma autoszómális domináns öröklődésmentű, nagy penetranciájú tünetegyüttes, melynek a lágyrész- és oszteoszarkóma, emlőrák, központi idegrendszeri daganatok és leukémia mellett az ACC is egy manifesztációja [99–101]. A betegséget leggyakrabban a *TP53* gén funkcióvesztését eredményező mutációi okozzák. A Beckwith-Wiedemann szindróma hátterében a fokozott IGF-2 szignalizáció áll. Klinikai jellemzői közé tartozik a hasfali defektusok, makroglosszia és számos daganat manifesztációja. A betegség hátterében az IGF-2-t kódoló kromoszómális régió genomiális imprintgének zavara, gyakran paternális uniparentális diszómia található [102]. Az autoszómális domináns öröklődésmentű familiáris adenomatózus polipózis (FAP) leggyakrabban a vastagbél polipózisában manifesztálódik, de előfordulhat ACC is [103]. Hátterében az *APC* gén inaktiváló mutációi állnak. Ép formában az *APC* – együttesen más proteinekkel – a β -katenin ubiquitin-mediálta degradációját regulálja, hibás *APC* esetén a Wnt/ β -katenin szignalizáció fokozódása vezet a daganatképződéshez [104].

Az újabb genetikai vizsgálatokkal, melyeket új generációs szekvenálással végeztek megerősítették a *TP53*, *NF1*, *MEN1*, *CTNNB1*, *CDKN2A* és *RB1* gének mutációit [105,106], de ezek mellett, felvetették új gének (pl. *ZNRF3*) patogenetikai szerepét a Wnt/ β -katenin útvonalhoz kapcsolódó daganatképződésben [106].

II.2.1.2. Molekuláris mechanizmusok ACC-ben

A Wnt/ β -katenin útvonal konstitutív aktivitása a mellékvese adenómáinak és karcinómáinak gyakori jellemzője [93,107]. Ennek hátterében leggyakrabban a β -katenint kódoló gén (*CTNNB1*) aktiváló mutációi állnak, melynek következménye a Wnt stimulációtól független, konstitutív β -katenin szignalizáció. Ennek megfelelően, a fokozott nukleáris β -katenin expresszió rossz prognosztikai marker ACC-ben [108,109]. Az utóbbi időben néhány, a Wnt/ β -katenin jelátvitelt gátló hatóanyag került fejlesztésre, melyek újabb farmakológiai lehetőségeket jelenthetnek ACC-ben is [110].

Az ACC-ben tapasztalható fokozott IGF-2 jelátvitel oka a 11p15 kromoszómarégió genomiális imprintgének megváltozása – leggyakrabban paternális uniparentális diszómia formájában, melyet az ACC szövetek kétharmadában igazoltak [111]. ACC sejtvonalakon végzett kísérletek kimutatták, hogy az IGF jelátvitel gátlása önmagában és mitotánnal vagy mTOR inhibitor sirolimus-szal kombinálva a proliferáció gátlásán keresztül ígéretes antineoplasztikus potenciállal bírhat [112,113]. Ezen ígéretes *in vitro* eredményekkel ellentétben, a kismolekulájú IGF-1-receptor-gátló linsitinib egy friss klinikai vizsgálat tanúsága alapján hatástalannak bizonyult [114].

A nagy áteresztőképességű technikákkal végzett transzkripciós profil vizsgálatok a mellékvesekéreg daganatainak molekuláris patogenezisének tisztázásában is fontos előrelépést jelentettek. De Reynies és munkatársai összesen 153 adrenokortikális daganat vizsgálatával számos génexpressziós különbséget írtak le adenómák és karcinómák között, valamint a karcinómákon belül – a transzkripciós profil alapján – a prognózis függvényében két csoportot definiáltak [115]. Giordano és munkatársainak munkája összesen 2875 gént azonosított, melyek megváltozott expressziót mutattak ACC-ben ACA-hoz és normál mellékvesekéreghez képest és igazolta de Reynies és kollégái észrevételét a génexpressziós mintázatban és klinikai prognózisban is különböző két ACC csoportról [116]. Munkacsoportunk teljes gén és miRNS expressziós profilt vizsgálva 6 olyan miRNS-t azonosított, mely megváltozott expressziót mutattak különböző mellékvesekéreg daganatokban [117], ami felvetette, hogy a szöveti miRNS expresszió mérése segíthet – nem egyértelmű hisztopatológiai lelet esetében – a dignitás meghatározásában [117]. Ezen nagy áteresztőképességű tanulmányok metaanalízise több, korábban nem tisztázott, jelentős patogenetikai útvonalat, így a sejtciklus, a reténsav jelátvitel, a komplemenrendszer és az antigén prezentáció megváltozott működését írta le [118].

II.2.2. Klinikai hormontútermeléssel nem járó, jóindulatú mellékvesekéreg daganatok

A klinikai hormontútermeléssel nem járó mellékvese daganatokat rendszerint véletlenül, más okból végzett hasi radiológiai képalkotó vizsgálatokkal ismerik fel, pl. a hasi CT vizsgálatok 0,34-4,36%-ában mutathatók ki [119]. A klinikai gyakorlatban elterjedt incidentaloma kifejezés is erre utal. Többségük (70-94%-uk) klinikai hormontútermelést nem okozó benignus mellékvesekéreg adenoma. Bár a betegek többségében klinikai hormontútermelés nem mutatható ki, enyhe hormonális eltérések és metabolikus rendellenességek nagy gyakorisággal fordulnak elő [120]. Kimutatták, hogy a klinikai hormontútermeléssel nem járó mellékvese adenomák gyakrabban fordulnak elő túlsúlyos betegekben [119,121] valamint szénhidrát anyagcserezavarban szenvedő és hipertóniás egyéneknél [119,122,123]. A betegek egy csoportjában a Cushing szindrómában megfigyelhető hormon-laboratóriumi eltérések is kimutathatók [120,123,124]. A szubklinikai hormonális eltérések növelhetik a metabolikus eltérésekre való [125] és magyarázatul szolgálhatnak klinikai hormontútermeléssel nem járó mellékvesekéreg adenomás betegekben az elhízás, hypertonia, hiperlipidémia és diabétesz gyakori előfordulására.

Hormontútermeléssel nem járó mellékvesekéreg daganatos betegekben a metabolikus eltérések nagy gyakoriságának azonban egyéb oka is lehet. Egy feltételezés szerint a magas inzulin szint hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenoma kialakulásához vezethet; ezt a feltételezést támasztja alá az inzulinnak a mellékvesekéreg sejtek proliferációját serkentő hatása, melyhez nem társul kortizol szekréció növekedés [126].

Mellékvese adenoma szövetek 28-61%-ában mutattak ki kromoszóma eltéréseket, leggyakrabban a 2, 11q, 17p, 4 és 5-ös kromoszomákon [14]. Sporadikus mellékvese adenomás betegek körében végzett vizsgálatokkal néhány esetben a 21-hidroxiláz gén (*CYP21A2*) csírasejtes mutációit mutatták ki [127,128]. A klinikai hormontútermeléssel nem járó, sporadikus mellékvesekéreg adenomák többsége egyoldali, azonban az esetek 8,9-15%-ában mindkét mellékvesében adenoma mutatható ki [120,124]. Néhány tanulmány szerint kétoldali mellékvesekéreg adenomás betegekben az egyoldali esetekhez képest gyakrabban észlelhetők enyhe hormonális eltérések [129]. A mindkét mellékvesét érintő tumor-képződés szisztémás patogenetikai hatás lehetőségére utal, bár ilyen szisztémás faktort (mint például a *CYP21A2* gén csírasejtes mutációját) a kétoldali mellékvesekéreg adenomás betegek kis számában lehetett igazolni [127,130]. Figyelmet érdemel azonban, hogy a klinikai hormontútermeléssel nem járó kétoldali mellékvesekéreg adenomák gyakorisága lényegesen nagyobb annál, mint amit két egyoldali adenoma véletlenszerű együttes előfordulása esetén várnánk.

Számos tanulmány alapján bizonyosnak tartható, hogy a hormontúltermelés hiánya ellenére az adenomák többségében a szteroid termelés kóros, sőt a HPA tengely szabályozása is károsodott. Egyik leggyakoribb szteroid-termelési zavarként tartják számon, hogy véletlenszerűen felfedezett mellékvesekéreg daganatos betegek többségében exogén ACTH adásával a normálist meghaladó plasma 17-hidroxiprogoszteron (17-OHP) válasz váltható ki [123,129,131–133]. Erre a megfigyelésre alapozva feltételezték, hogy a szteroid bioszintézisben szerepet játszó 21-hidroxiláz enzim részleges defektusa szerepet játszhat a hormonálisan inaktív mellékvese daganatok pathomechanismusában. Ezt a hipotézist támasztotta alá Jaresch és mts. megfigyelése is, mely szerint a veleszületett 21-hidroxiláz defektusos betegek 45-78 %-ában CT vizsgálattal mellékvesekéreg daganat mutatható ki [134]. A hipotézist támogató indirekt klinikai megfigyelések ellenére a 21-hidroxiláz enzim (vagy egyéb szteroid bioszintézis enzimek) örökletes defektusainak [135–139] lehetséges oki szerepe a hormonálisan inaktív mellékvese adenomák kialakulásában nem tekinthető bizonyítottnak, ugyanis a szteroid bioszintézis enzimeket kódoló gének mutációinak szomatikus vagy csírasejtes előfordulásának és az enzimdefektusokra jellemző laboratóriumi eltérések összefüggéseit hormonálisan inaktív mellékvese adenomás betegekben mindezidáig nem vizsgálták.

II.3. GLÜKOKORTIKOID RECEPTOR (GR)

A glükokortikoid hormonok számos alapvető élettani funkció szabályozásában részt vesznek. Metabolikus hatásai révén szerepük van a szénhidrát-, fehérje- és zsírsavcsere szabályozásában és fontos hatásokat fejtenek ki számos szerv és szervrendszer működésére. Kiemelt jelentőségű a glükokortikoidok immunrendszert moduláló és apoptózist indukáló hatása, amely számos betegségben megalapozza terápiás alkalmazásukat.

A glükokortikoidok hatására létrejövő fiziológias válasz és a glükokortikoidok iránti érzékenység lényegesen különbözhet a különböző fajokban, egyedekben, szövetekben és sejttípusokban, sőt egy adott sejt esetében is a sejtciklus különböző fázisaiban. Humán vizsgálatok szerint egészséges egyének plazma kortizol szintjében nagyfokú egyéni variabilitás figyelhető meg, amely felveti annak a lehetőségét, hogy a HPA tengely feedback érzékenységét genetikai tényezők befolyásolhatják.

A glükokortikoidok hatását közvetítő GR többféle, ugyanazon génről átíródó izoformáját fedezték fel, amelyek a helytől és körülményektől függően eltérő arányban képződhetnek és szerepük lehet a glükokortikoidok hatására kialakuló biológiai válasz variabilitásában. A GR genetikai variánsai is befolyásolhatják a receptor működését; a *GR* gén mutációi glükokortikoid rezisztencia szindrómát okozhatnak, míg az egészséges populációban gyakran előforduló *GR* gén polimorfizmusok a receptor működés enyhe változása miatt növelhetik vagy csökkenthetik bizonyos betegségek kialakulásának kockázatát.

A *GR*-t kódoló gén (NR3C1, GenBank accession numbers: NM_000176, AY436590, NT_029289) az 5q31 kromoszóma szakaszon található. A gén 9 exonból áll, a fehérje kódoló rész a 2-es exonon kezdődik. A -2300 bp-tól kezdődő promotor régióban kötőhelyek találhatók sokféle transzkripció faktor számára (pl Sp1, AP-1, YY 1, NF-κB, és maga a GR). Ez a szabályozó repertoár hozzájárulhat az egyébként ubiquitáer GR expresszió sejt- és szövet-specifikus szabályozásához [140].

II.3.1. A GR genetikai variánsai és klinikai jelentőségük

II.3.1.1. *GR* génmutációk

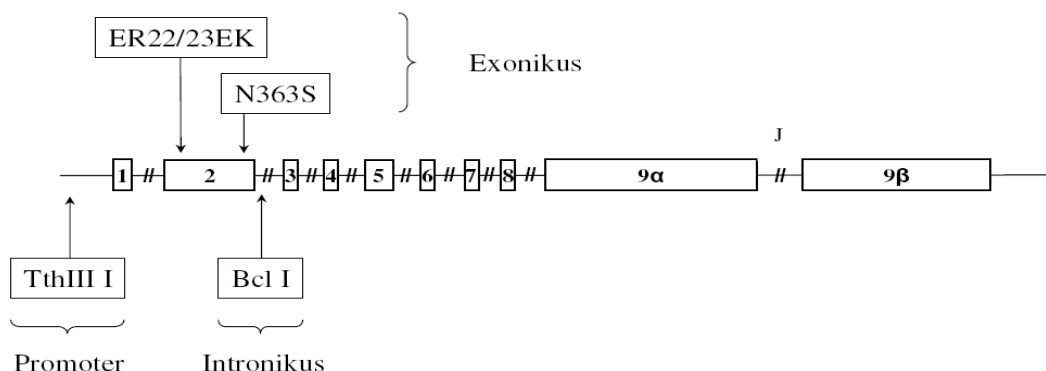
A glükokortikoid rezisztencia szindrómát napjainkig mindössze tíz családban és néhány sporadikus esetben írták le; ezek egy részében a betegség-okozó genetikai eltérést is azonosították. A szindróma jellegzetessége, hogy megtartott circadian ritmus mellett megnövekedett plazma kortizol szint ellenére a Cushing szindróma klinikai tünetei hiányoznak (sőt egyes esetekben a glükokortikoidok iránti csökkent érzékenység miatt hypadrenia tüneteit figyelték meg), azonban a kortizol feedback csökkenése miatt megnövekedett ACTH az androgének és mineralokortikoidok

túltermelését és következményes klinikai tüneteket vált ki (nőkben acne, hirsutismus és rendellenes vérzés, férfiakban oligospermia és infertilitás, mindkét nemben hipertónia és hipokalémiás alkalózis). A betegség autoszomális domináns és recesszív öröklődésű formáit írták le; a kisszámú közölt esetben a betegség penetranciája különböző volt. Az esetek egy részében a *GR* gén csírasejtes mutációját is igazolták, melyek többsége az LBD szakaszon helyezkedett el. Ezeknek a *GR* gén mutációknak, valamint az LBD szakaszon *in silico* módszerrel felfedezett *GR* gén variánsoknak a receptor háromdimenziós szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata a *GR* működés zavarát valószínűsítette [141]. Néhány mutáció esetében a ligandkötés, illetve receptor működés zavarát *in vitro* módszerekkel is bizonyították [142]. A glükokortikoid rezisztenciában szenvedő betegekben azonosított csírasejtes *GR* gén mutációkon kívül leukémia sejtvonalakon is számos *GR* gén mutációt találtak, továbbá *in vitro* módszerekkel számos *GR* gén variánst állítottak elő [143]. Szomatikus *GR* gén mutációkat Nelson szindrómában [144] és lupusz nefritiszben szenvedő betegek szöveteiben mutattak ki [145].

Néhány adat arra utal, hogy a glükokortikoidok iránti érzékenység lokális csökkenése összefügg az autoimmun betegségek kialakulásával és azok súlyosságával. Lupus nephritiszes betegek mononukleáris sejtjeiben a *GR* szám kisebb volt az egészséges kontrollokéhoz képest, és a betegek 20,5%-ában mutattak ki a *GR* gén 9-es exonon egy kereteltolódással járó nukleotid-inzerciót a 2439-es pozícióban, azonban ennek a mutációnak a receptor működésére gyakorolt hatását nem vizsgálták [145].

II.3.1.2. *GR* polimorfizmusok

A glükokortikoid érzékenység az egészséges populációban is variabilitást mutat [146]. Az utóbbi két évtizedben több *GR* SNP-vel kapcsolatban kimutatták, hogy részleges szerepe van a glükokortikoid iránti érzékenység változatosságában [147]. Az ER22/23EK előfordulása enyhe glükokortikoid rezisztenciával, valamint muszkuláris jellegű fenotípussal mutatott összefüggést [148,149], ami annak köszönhető, hogy *GR*-A fehérje izoformából több keletkezik, melynek az ER22/23EK jelenléte esetén kisebb a további transzkripciót serkentő hatása [150]. Az N363S és a BclI polimorfizmusok esetén fokozott glükokortikoid érzékenységgel magyarázható eltéréseket, például többek között magasabb testtömeg-indexet találtak [147]. Az intron B-ben található BclI polimorfizmus esetén a legelfogadottabb feltételezés, hogy *GR* transzkripciója során a polimorfizmus a promoter régióval kerül térközbe és így befolyásolja a transzkripció folyamatát (7. ábra). A gén promoterében található TthIII I [151] polimorfizmus önmagában nem okoz változást a glükokortikoid érzékenységben, ugyanakkor más polimorfizmusokkal egy haplotípusban való előfordulása esetén szintén befolyásoló tényezőként tartják számon [152].



7. ábra: A GR leggyakrabban vizsgált polimorfizmusainak elhelyezkedése a GR génben
(Számokkal az egyes exonok kerültek jelölésre. J: junkcionális régió)

Az egyes GR polimorfizmusok klinikai jelentőségét több tanulmány, közöttük munkacsoportunk is vizsgálta (**11. táblázat**). Luczay és munkatársai congenitalis adrenalis hiperplázia nem klasszikus formájában ritkábbnak találták az N363S polimorfizmus előfordulását, melyet azzal is magyaráztak, hogy a fokozott glükokortikoid érzékenység kompenzálja az enzimdefektust okozó egyébként jelentősebbnek várt virilizáló hatást [153]. Graves-kórban megjelenő oftalmopátia esetén az enyhébb klinikai manifesztáció esetén gyakoribb volt a BclI polimorfizmus előfordulása, mint a súlyosabb fenotípus esetén. Ennek magyarázatát az endogén glükokortikoidok fokozottabb hatásában látták az érzékenyítő jellegű BclI polimorfizmus jelenléte esetén [154]. Élettani terhesség során az ER22/23EK polimorfizmus jelenléte védőfaktornak bizonyult a terhesség alatti jelentős testsúly, illetve BMI növekedéssel szemben [155]. Míg endogén glükokortikoid túltermelés esetén a BclI polimorfizmus homozigóta jelenléte alacsonyabb csontsűrűséggel járt, mint homozigóta vad genotípus esetén [156].

Az irodalmi adatok alapján a fokozott glükokortikoid érzékenység és BclI polimorfizmus közötti kapcsolatot több tanulmányban is alátámasztották [157,158]. A polimorfizmus és a nagyobb csípő-derék arány, emelkedett BMI, továbbá anyagcsere változásokkal, úgy mint a hasi, illetve visceralis obesitás, a metabolikus szindróma, emelkedett szérumszintű LDL koleszterin szint, gyakoribb inzulinrezisztencia összefüggésével ismertek adatok [159–165].

Akut limfoblasztos leukaemia miatt glükokortikoidokat is tartalmazó kemoterápiás protokollal való kezeléskor összefüggést találtak az előnyösebb relapszus ráta és a homozigóta BclI genotípus előfordulása között [166]. Ugyanakkor a megváltozott glükokortikoid érzékenységnek szerepe lehet a HPA tengely rendellenes működésében is [167], krónikus pszichoszociális stressz, a poszttraumás stresszválaszreakcióban, a sclerosis multiplex, a rheumatoid arthritis, a gyermekkori nefrózis szindróma előfordulásában [168–171].

11. Táblázat: A glükokortikoid receptor gén négy polimorfizmusának klinikai összefüggései

Polimorfizmus	Allél-frekvencia	In vitro hatás	Klinikai összefüggések
N363S	1,62%- 7,15%	Receptor érzékenység nő	- nagyobb BMI - centrális elhízás - kisebb csontsűrűség tendencia - gyakoribb koronária betegség és instabil angina - nagyobb össz koleszterin és kisebb HDL koleszterin arány - stresszreakció során nagyobb kortizol elválasztás
ER22/23EK	1,78%- 4,45%	Receptor érzékenység csökken	- kisebb inzulin szint és kisebb inzulin rezisztencia - kisebb össz koleszterin és HDL koleszterin - férfiakban nagyobb testmagasság és izomerő - hosszabb túlélés - idősokban kisebb CRP - kevesebb fehérállományi lézió és demencia
Bcl I	25,7%- 49,2%	?	- BMI-vel ellentmondásos adatok - viscerális elhízás - hyperinzulinémia - hipertónia - nagyobb kortizol szint
TthIII I	30%-38%	?	- nagyobb 24 órás kortizol elválasztás és nagyobb esti plazma kortizol szint

Munkámban a jóindulatú mellékvesekéreg daganatok patogenitása és a megváltozott glükokortikoid érzékenység vizsgálata kiemelt jelentőségű volt. Genetikai asszociációs vizsgálatokat és funkcionális genetikai vizsgálatokkal kerestük az összefüggéseket a GR-hoz társult mechanizmusok szerepére mellékvesedaganatokban.

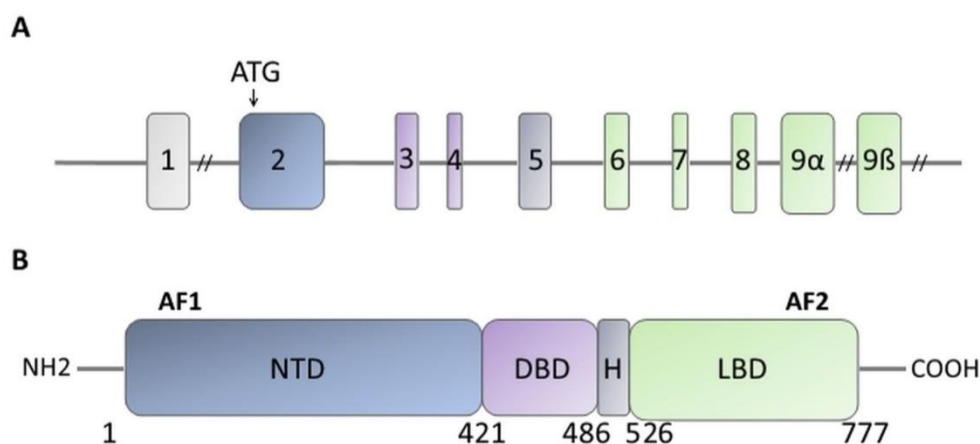
II.3.2. A GR izoformák és klinikai jelentőségük

A GR gén emberben több (legalább 16 monomer és 256 homo- illetve heterodimer) receptor izoformát kódol, amelyek a különböző szövetekben változatos transzkripciós aktivitással rendelkezhetnek és különböző cél génekre hathatnak [140]. A glükokortikoid hormonhatás komplexitását részben a többféle receptor izoforma okozza.

A GR fehérje szerkezetileg 3 fő doménból áll (**8. ábra**). Az 1-421 aminosavak alkotják az N-terminális domént, mely a transzaktivációs hatásért felelős aktivációs faktort (AF1) tartalmazza. Az AF1 ligand hiányában is számos transzkripciós kofaktorral képes interakcióba lépni és több foszforilációs szabályozóhelyet tartalmaz. 65 aminosav alkotja a DNS-kötő domént (DBD), amely a receptor középső régiójában helyezkedik el és a DNS-kötésen kívül fontos szerepet tölt be a receptor dimerizációjában is. Itt helyezkedik el a receptor sejtmagba történő transzportjáért felelős egyik nukleáris lokalizációs aldómén (NLS1). A DBD ezen kívül képes interakcióba lépni más proteinekkel is [140,172,173]. A C-terminális domént egy 40 aminosavból álló ún. hinge régió köti össze a DBD-nel. A hinge domén egy flexibilis régió, amelynek a dimerizációban és a DNS-kötést követő megfelelő konformáció kialakításában van szerepe [174]. Az 527-777 aminosavak alkotják a

ligandkötő domént (LBD). A régióban található egy második nukleáris lokalizációs szignált (NLS2) tartalmazó motívum. Az LBD a chaperon kötődésben, valamint a receptor dimerizációban is szerepet játszik. Ligandkötést követően aktiválódik az LBD-ben elhelyezkedő AF2 aldomén, amely további koaktivátor és korepresszor fehérjék kötődését teszi lehetővé [175–178]

A leggyakoribb izoformák a GR α izoforma és a 9. exon alternatív splicing-ja útján keletkező GR β izoforma.



8. ábra (A) GR gén szerkezete. (B) GR fehérje szerkezete. Rövidítések: NTD, N-terminális domén; DBD, DNS-kötő domén; H, hinge régió; LBD, ligandkötő domén; AF1, aktivátor funkció 1; AF2, aktivátor funkció 2

Az 1. exon az 5' nem transzlálódó régiót kódolja, a GR fehérje N-terminális része a 2. exonról íródik át. A 3 és 4-es exonok kódolják a DNS-kötésért felelős cink ujjas motívumokat, míg a többi exon a ligand-kötésért felelős struktúrákat alkotja. A 9-es exon alternatív splicingja (9 α és 9 β) következtében két eltérő tulajdonságú ligand kötő domén jöhet létre [179,180]. A GR α és GR β izoformák 1-727 aminosav szakasza azonos, míg az ezt követő karboxi-terminális szakasz különböző. A 777 aminosavból álló GR α felel meg a hormonhatást közvetítő formának, míg a 742 aminosavból álló GR β izoforma nem rendelkezik hormon-kötő és géntranszkripciót aktiváló képességgel [177]. Egyre több adat szól amellett, hogy a GR β izoforma domináns negatív hatást fejt ki az aktív GR α működésére.

Csonkolásos vizsgálatok során, ha a GR β C-terminális végét alkotó 15 egyedi aminosavat eltávolítjuk, az így keletkezett csonkolt receptor továbbra sem képes dexametazon kötésre, azonban megszűnik a GR α -ra kifejtett gátló hatása [176,181]. További vizsgálatok a GR β LBD-jének gátló hatását mindössze két β -izoforma specifikus aminosav jelenlétére szűkítették. A GR β expressziója a GR α -nál kisebb mennyiségben, de szintén számos szövetben kimutatható. Sejt- és szövetspecifikus módon a sejten belül elsősorban a sejtmagban helyezkedik el, azonban a citoplazmában is

megtalálható [182]. Kimutatták, hogy a GR β sejtmagi lokalizációja szükséges a GR α antagonistahatás kialakulásához [182]. A GR β többféle mechanizmus útján képes gátolni a GR α funkciót. Mivel mindkét izoforma rendelkezik DBD-nel, ezért a GR α versenghet az inaktív GR β -val a GRE kötőhelyekért, továbbá egymással összekapcsolódva inaktív GR α -GR β heterodimereket is létrehozhatnak [183–185]. Ezen kívül a GR β az AF1 doménjén keresztül megkötheti a p160 koaktivátor komplex tagjait, többek között a GRIP1 koaktivátort, így kompetitív módon képes gátolni a GR α transzkripciós aktivitását [142].

Az elmúlt években egyre több kutatás támasztja alá, hogy a GR β szabályozó hatása nem kizárólag a GR α gátláson keresztül valósul meg. Teljes genom génexpressziós vizsgálatok alapján a GR β izoforma a GR α hiánya esetén is képes szabályozni a géntranszkripciót [186]. A GR β túltermelés hatására a GR α -tól eltérő gének expressziója változik meg [187,188]. Mindezek alapján a GR β önálló, a GR α -tól független transzkripciós aktivitással is rendelkezik. Ennek a mechanizmusa kevésbé ismert, mivel a GR β nem képes glükokortikoid kötésre és a klasszikus GRE szekvenciákat sem képes indukálni. Lewis-Tuffin és munkatársai ugyanakkor kimutatták, hogy a nem specifikus GR antagonist RU486 képes kötődni a GR β -hoz, ráadásul fokozza a receptor sejtmagba történő transzlokációját. Mindezen kívül úgy tűnik, hogy az RU486 inkább gátolja a GR β önálló transzkripciós aktivitását [186]. A GR β RU486 kötő képessége ugyanakkor ellentmondásos, mivel egy későbbi tanulmányban nem sikerült az előző megfigyeléseket megerősíteni [187]. A GR β túltermelés által szabályozott gének többségében nem található klasszikus GRE, így a GR β önállóan elsősorban nem a hagyományos glükokortikoid reszponzív géneket szabályozza. Elképzelhető, hogy a GR β fehérje-fehérje interakción, vagy más transzkripciós faktorokon keresztül fejt ki önálló szabályozó hatását. Ezt támasztja alá, hogy a GR β AF1 doménjével a GR α -hoz hasonlóan interakcióba léphet más transzkripciós komplexekkel [189]. Kelly és munkatársai kimutatták, hogy a GR β képes kapcsolódni a hiszton-deacetiláz 1-hez (HDAC1) és a HDAC-k közvetítésével gátolja az *IL5* és *IL13* gének expresszióját [190]. A közelmúltban került felfedezésre, hogy a GR β a *PTEN* transzkripció és az AKT1 foszforiláció szabályozásán keresztül képes fokozni az inzulin stimulálta növekedési útvonalat [191]. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy a GR β , a GR γ izoformához hasonló módon, egyelőre nem ismert GRE-szerű, GR β specifikus szekvenciákat képes aktiválni [189,192]. GR β izoforma expressziója számos sejt- és szövettípusban (neutrofil granulocita, monocita, vázizomzat, máj, vese, tüdő, szív, agy, ornyálkahártya) kimutatható, azonban a GR α -hoz képest kb. 400-szor kisebb mértékben [193]. Ennek megfelelően az egyes szövetekben a GR β fehérje igen kevés mennyiségben, vagy egyáltalán nem detektálható [193,194]. A GR β fiziológiai szerepe nagyrészt ismeretlen, azonban figyelemre méltó, hogy az evolúció során az emberi változattól függetlenül zebrahalban is kialakult egy a humán GR β -nak megfelelő GR izoforma.

Ezen kívül a közelmúltban egerek májában is sikerült azonosítani a GR β izoformát, és a kísérletek felvetették szerepét az anyagcsere szabályozásában [189,195].

Asztmában, egyes autoimmun betegségekben és leukémiában is emelkedett GR β expresszió mutatható ki, amely összefüggést mutatott a szöveti szteroid-rezisztencia kialakulásával [140]. Glükokortikoid-inszenzitív asztmás betegek bronhciális mosófolyadékból származó makrofágokban, légúti T-sejtekben és perifériás vér mononukleáris sejtekben (PMBC) is emelkedett GR β expressziót mutattak ki [196–198]. Ehhez hasonlóan, szteroid-rezisztens rheumatoid arthritisben, Crohn betegségben és ulceratív colitisben szenvedő betegek PMBC-ben is emelkedett GR β expressziót találtak a glükokortikoidokra jól reagáló betegekhez képest [199–201].

Egyes proinflammatorikus citokinek, például interleukinok, TNF α és interferonok képesek indukálni a GR β expressziót [189]. Webster és Leung vizsgálataik során megállapították, hogy citokinek hatására fokozódik a GR β expresszió és a megnövekedett GR β /GR α arány korrelált a sejtek glükokortikoid-érzékenységevel [197,202]. Ezen kívül akut és krónikus limfoid leukémiában az emelkedett GR β /GR α arány megakadályozta a daganatos sejtek glükokortikoid indukált apoptózisát [203,204]. Egyes szerzők ugyanakkor megkérdőjelezik a GR β szerepét a szteroid-rezisztencia kialakulásában. Néhány sejttypusban nem sikerült megfigyelni a GR β GR α -t antagonizáló hatását, továbbá az in vitro kísérletekben a GR α -hoz képest legalább 5-szörös GR β többletre volt szükség a gátló hatás kifejtéséhez, míg élő szervezetekben a GR β expresszió mindössze töredéke a GR α -nak. A génexpresszió mértéke ugyanakkor nem feltétlenül korrelál a fehérje mennyiséggel, azonban jelenleg nem rendelkezünk átfogó vizsgálatokkal, amelyek a GR β fehérjét vizsgálják szteroid-érzékenység tükrében. [187,188,205].

II.3.3. Egyéb, ritkább GR izoformák

Az mRNS feldolgozás során további izoformák is keletkezhetnek, melyek jelentőségéről és hatásáról egyelőre kevés ismerettel rendelkezünk. A GR-A izoformában hiányoznak az 5-7 exonok, a GR-P izoforma a 8-9-es exonok deléciója, míg a GR- δ izoforma a 2-es exonon belüli deléció következtében jön létre. A GR-P megnövekedett expresszióját mérték többek között hematológiai betegségekben és kissejtes tüdőkarcinómában [206]. A GR-S1 és GR-DL1 izoformák csonka fehérjéket kódolnak és transzaktivációs képességük csökkent. A közelmúltban felfedezett GR-NS1 izoforma ugyanakkor megnövekedett aktivitással rendelkezik [206].

A 2-es exonon belül található eltérő transzlációs iniciációs helyek következtében a GR α -nak legalább 8 különböző fehérje izoformája (GR α -A, B, C1, C2, C3, D1, D2 és D3) keletkezhet, melyek közül a GR α -A kódolja a teljes, 777 aminosav hosszúságú receptort. Az egyes fehérje izoformák szövet specifikus módon expresszálódnak, különböző a sejten belüli lokalizációjuk és eltérő transzkripciós aktivitással rendelkeznek [178].

A GR γ izoforma alternatív splicing következtében, a klasszikus GR α -tól mindössze egyetlen, a DBD-ben elhelyezkedő arginin aminosav inzercióban különbözik [207]. A GR γ is számos szövetben expresszálódik, a teljes GR transzkripció körülbelül 4-8%-át teszi ki.[206]. A γ -izoforma glükokortikoid kötést követően a GR α -nál gyengébben, de képes aktiválni a GRE-t tartalmazó promotereket [208]. Glükokortikoid kezelést követően a GR γ számos gént a GR α -hoz hasonlóan szabályoz, azonban microarray vizsgálatok alapján GR α - és GR γ -specifikus géneket is azonosítottak. Kimutatták, hogy az aminosav inzerció következtében megváltozik a fehérje szerkezete, ezáltal részben megváltozik a receptor DNS-kötő preferenciája [192]. Érdekes módon azonban a GR γ egyidejű expressziója a GR α -val megszüntette a glükokortikoidok nukleáris faktor κ B-n (NF- κ B) keresztül kifejtett gyulladásgátló hatását, ezáltal szerepet játszhat a glükokortikoidok elleni rezisztencia kialakulásában [208].

II.3.4. A GR poszttranszlációs módosulása

A GR fehérje számos poszttranszlációs módosuláson mehet keresztül, melyek megváltoztatják a receptor sejten belüli lokalizációját, élettartamát és transzkripciós aktivitását. Ezek közül a foszforilációs szabályozás a legjobban ismert, eddig legalább 6 különböző kinázt és számos foszfatázt ismerünk, amely befolyásolja a GR foszforilációs mintázatát [206]. Ligandkötést követően a GR foszforilációs mintázata megnövekszik. A foszforilációs helyek az AF1 aldóménben helyezkednek el és befolyásolhatják a GR transzkripciós aktivitását. A Ser211 foszforilációjáról kimutatták, hogy elősegíti a DRIP/TRAP koaktivátor komplex kötődését, ezáltal fokozza a GR transzkripciós aktivitását [177]. A Ser226 és Ser404 aminosavak foszforilációja ugyanakkor a fokozott nukleáris export következtében csökkenti a GR transzkripciós aktivitását [206].

További poszttranszlációs szabályozásra ad lehetőséget a fehérjék ubiquitin és small ubiquitin-like modifier (SUMO) molekulákkal történő összekapcsolása. Az ubiquitin-proteasóma útvonal fontos szerepet tölt be a fehérjék lebontásában, míg a SUMO jelölés elsősorban a fehérje stabilitást, a sejten belüli lokalizációt, a transzkripciós aktivitást és a fehérje-fehérje interakciót képes befolyásolni. A GR fehérjében eddig legalább egy ubiquitin és három SUMO jelölőhelyet azonosítottak, melyeken keresztül a receptor szabályozódhat [178]. A közelmúltban Nader és munkatársai kimutatták, hogy a GR acetiláció útján is képes szabályozódni. A molekuláris cirkadián óra egyik komponense, a CLOCK:BMAL1 heterokomplex a GR hinge régiójának acetilálása következtében gátolja a GR transzkripciós aktivitását [209].

II.3.5. A GR jelátviteli út

II.3.5.1. A GR genomiális hatásai

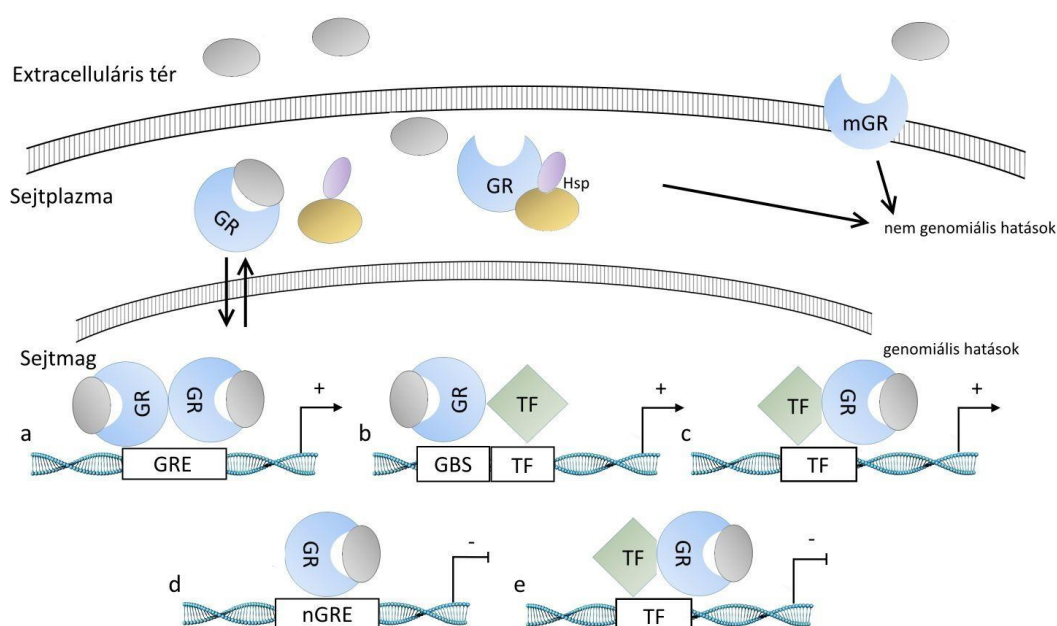
A szteroid hormonok passzívan képesek a sejtmembránon áthatolni, majd a megfelelő nukleáris receptorhoz kapcsolódva fejtik ki transzkripció hatásait. A GR ligand hiányában, a sejt plazmában, egy több fehérjéből álló heterokomplexhez kapcsolódva helyezkedik el. A komplex tagjait többek között hősokk-fehérjék (hsp70, hsp90), a p23 chaperon és immunophilinek (FKBP51, FKBP52, CYP-40) alkotják [210]. A komplex fontos szerepet tölt be a GR hormonkötésre alkalmas konformációjának kialakításában és nukleáris transzportjában [211]. Ligandkötést követően a GR konformációja megváltozik, disszociál a heterokomplextől, majd a sejtmagba transzlokálódik. A sejtmagon belül a GR homodimert alkotva direkt DNS-kötődés által vagy más transzkripció faktorokkal történő interakciókon keresztül szabályozza a célgén expresszióját (9. ábra).

A glükokortikoid hatás következtében indukálódó gének promoterében általában megtalálható glükokortikoid-érzékeny szekvencia (GRE), [178,180]. Újabb kutatások alapján a GR monomerként is aktiválhat olyan géneket, melyben a palindrom GRE szekvencia egyik fele (half-site GRE) van jelen [212]. Ráadásul egyes gének transzkripcióját a GR monomerként közvetlenül is gátolhatja az úgynevezett negatív GRE (nGRE) szekvenciákon keresztül [213]. Kromatin immunoprecipitációs (ChIP) vizsgálatok alapján a GR nem képes a genomban található számos GRE kötőhely mindegyikét elfoglalni [206]. A nyitott kromatinállomány sejt-specifikus mintázata befolyásolja a glükokortikoid kötőhelyek (GBS) hozzáférhetőségét, ezáltal szabályozhatja a glükokortikoidok szövetspecifikus hatásait [214]. A glükokortikoid kötőhelyek gyakran a transzkripció start helytől (TSS) egészen távol, akár több mint 10kb távolságra helyezkednek el. Érdekes módon az indukálódó gének esetében inkább proximális, míg a repressziót mutató gének esetében disztális GR kötődési tendencia figyelhető meg [215,216]. A genomon belül az egyes gének eltérő glükokortikoid-érzékenységgel rendelkeznek. Bizonyos gének már egészen alacsony koncentrációjú glükokortikoid kezelésre is reagálnak, míg más gének transzkripciója csak nagyobb dózist követően változik meg. A génspecifikus GR rezponzivitás háttérében a kromatinállomány hozzáférhetősége és a receptor GBS-ok közelében elhelyezkedő egyéb transzkripció faktorokkal történő interakciója állhat [217]. Számos nukleáris kofaktor képes fokozni (CBP, p300, SRC1 és GRIP) vagy éppen gátolni (N-CoR1, N-CoR2, HDAC, szirtuin) a GR transzkripció aktivitását [216].

ChIP vizsgálat alapján a GR számos olyan DNS szakaszokhoz is kötődik, amely nem tartalmaz klasszikus GRE szekvenciákat. Ezekben az esetekben a GR más transzkripció faktorok segítségével képes kötődni jellemzően inkomplett GRE szekvenciákhoz és ezáltal serkenteni vagy

gátolni a transzkripciót. Ezeket az összetett kötőhelyeket kompozit szekvenciáknak nevezzük. A GBS-ek közelében leggyakrabban aktivátor protein 1 (AP1) kötőhely azonosítható, amely a GR receptor egyik jól ismert kofaktora [215]. Az AP1 segít fellazítani a kromatinállományt, ezáltal elősegíti a GR kötődését a DNS-hez [218].

A GR DNS-kötődés nélkül, protein-protein interakción keresztül is képes szabályozni a transzkripciót. Ezek közül a legismertebb a GR-nak a NF- κ B és az AP1 transzkripciós aktivitásának gátlásán keresztül kifejtett gyulladáscsökkentő hatása. A GR fehérjén végzett mutációs vizsgálatok alapján a DBD fontos szerepet tölt be a transzrepresszió kialakulásában [216,219]. Kevésbé ismert, de a GR aktiváló hatást is kifejthet más fehérjékkel történő interakció által. Ezek közé tartozik a GR-STAT5 szinergista hatása a májsejtek glükokortikoid-függő növekedésében ésérésében [220].



9. ábra A GR genomiális és nem genomiális szabályozó mechanizmusainak egyszerűsített sémája. Az aktivált GR serkentheti a transzkripciót **(a)** direkt GRE-hez történő kötődés, **(b)** kompozit DNS szekvenciákhoz való kötődés, **(c)** transzkripciós faktorral történő direkt vagy indirekt fehérje-fehérje interakció által. Az aktivált GR gátolhatja a transzkripciót **(d)** nGRE-hez történő kötődés, **(e)** más transzkripciós faktorral történő direkt vagy indirekt fehérje-fehérje interakció által (Ratman, 2013 [216], nyomán). Rövidítések: GR, glükokortikoid receptor; mGR, membránkötött glükokortikoid receptor; Hsp, hő sokk proteinek; TF, transzkripciós faktor; GRE, glükokortikoid reszponzív szekvencia; GBS, glükokortikoid receptor kötőhely; nGRE, negatív glükokortikoid reszponzív szekvencia

Az aktivált GR serkenti a cink ujjas tristetraprolin fehérje (TTP) szintézisét, amely destabilizálja számos gyulladásos mediátor mRNS-ét, ezáltal fokozva lebontásukat [221]. Ishmael és munkatársai továbbá megfigyelték, hogy a GR direkt módon is képes befolyásolni egyes gének mRNS-ének stabilitását. Budesoniddal kezelt humán légúti laphámsejtekben a GR csökkentette a CCL2 és CCL7 mRNS-ek féléletidejét. Az aktivált GR az 5'UTR régió GC gazdag motívumához kapcsolódva

fejtette ki hatását és motívumkötődési predikciós vizsgálatok alapján akár több ezer transzkriptum mRNS-ének stabilitását is befolyásolhatja [222].

II.3.5.2. A GR nem genomiális hatásai

A glükokortikoidok nem csak a géntranszkripciót képesek befolyásolni, hanem a sejten belül azonnali, nem genomiális válaszokat is létrehozhatnak. A glükokortikoidok a membránfluiditást, a sejtproliferációt, a gyulladásos és immunválaszt, a sejten belüli ionháztartás-szabályozást, valamint központi idegrendszeri folyamatokat is képesek nem genomiális úton befolyásolni [223]. Többek között a glükokortikoidok HPA rendszerre kifejtett negatív feedback-je is feltételezhetően nem genomiális módon történik [223,224]. A glükokortikoidok nem genomiális hatásainak hátterében álló molekuláris mechanizmusok kevésbé ismertek. A membránfluiditást a glükokortikoidok a GR közvetítő hatása nélkül képesek szabályozni, míg más esetekben a GR heterokomplexből a ligandkötést követően felszabaduló fehérjék kináz aktivitása hoz létre azonnali változásokat [223,225]. A nem genomiális hatások létrejöttében az 1990-es években felfedezett membránhoz kötött glükokortikoid receptorok (mGR) is szerepet játszhatnak. Az endoplazmatikus retikulumban a GR olyan poszttranszlációs módosulásokon megy keresztül, amelyek elősegítik a sejtmembránba épülését, azonban az mGR jelátviteli mechanizmusáról egyelőre még keveset tudunk [226]. A közelmúltban fedezték fel, hogy a mGR glükokortikoid kötést követően aktiválja a p38-MAPK útvonalat, melyen keresztül számos sejten belüli folyamatot szabályozhat [180,226].

II.3.6. A glükokortikoidok gyulladásgátló hatása és a glükokortikoid-rezisztencia kialakulásának mechanizmusai IBD-ben

A glükokortikoidok erős gyulladásgátló hatását gyakran használják az IBD és más krónikus gyulladásos megbetegedések kezelésében. A glükokortikoidok többek között gátolják a T-sejt aktivációt és a proinflammatorikus citokinek transzkripcióját. Immunszuppresszív hatásuk hátterében több molekuláris mechanizmus is ismert. Ezek közül a legjobban tanulmányozott az NF- κ B proinflammatorikus jelátviteli útvonalra kifejtett gátló hatás. Az NF- κ B számos citokin, kemokin, komplement faktor transzkripciójának aktiválásán, valamint a ciklooxygenáz-2 indukció következtében fokozott prosztaglandin termelésen keresztül kulcsszerepet játszik a gyulladás kialakulásában és fenntartásában [227]. A glükokortikoidok gátolják az NF- κ B transzkripció hatását, valamint az I κ B serkentésén keresztül inaktív állapotban tartják a NF- κ B komplexet a citoplazmában [227,228]. Bakteriális, virális ingerek, citokinek, valamint UV fény okozta károsodás hatására a MAPK kaskádon keresztül aktiválódik a c-Jun transzkripció faktor, majd az így keletkező c-Jun:cFos heterodimerek aktiválják a számos gyulladásos mediátor promoterében megtalálható AP1 kötőhelyeket [219,227,229]. A glükokortikoidok a MAPK foszfatáz 1

indukcióján keresztül inaktiválják a MAPK foszforilációs kaszkád tagjait, ezáltal meggátolják az AP1-en keresztül történő gyulladásos aktivációt. Ezen kívül a glükokortikoidok protein-protein interakción keresztül is képesek gátolni az AP1 funkciót [219]. Egyes elméletek szerint, mivel az NF- κ B, AP1 és GR jelátviteli utak azonos transzkripciós koaktivátor fehérjéket képesek felhasználni, ezért lehetséges az, hogy a glükokortikoidok a koaktivátorok kompetitív gátlásán keresztül is kifejtik hatásukat [216]. Egyes gyulladásos mediátorok képesek stabilizálni a tumor nekrosis faktor α (TNF α) hírvivő RNS-t (mRNS), amely egyébként gyorsan lebontódna a citoplazmában. A GR aktiváció képes megfordítani ezt a folyamatot, aminek hatására a ribonukleázok újra képesek degradálni az mRNS-t [230].

Az elmúlt években számos kísérlet felvetette, hogy IBD-ben az elégtelen barrierfunkció is hozzájárulhat a gyulladás kialakulásához. *In vitro* kísérletek alapján a szteroidok antagonizálják a TNF α barrier permeabilitást növelő hatását, ráadásul a TJ fehérjék szabályozásán keresztül csökkentik a paracelluláris transzportfolyamatokat [231,232]. Mindezek alapján a glükokortikoidok nem csupán a gyulladást magát, hanem elképzelhető, hogy a gyulladást kiváltó folyamatokat is képesek befolyásolni IBD-ben.

Sajnálatos módon az IBD-ben szenvedő betegek egy részében a glükokortikoidok hatástalannak bizonyulnak, a szteroidok nem képesek elnyomni a T-limfociták és más gyulladásos sejtek túlműködését [228]. A rezisztencia kialakulásának hátterében számos molekuláris folyamat állhat. Ezek érinthetik a GR-t és a hozzá kapcsolódó kofaktorokat, a proinflammatorikus mediátorok működését, és a xenobiotikumok eltávolításáért felelős multi-drog rezisztencia 1 (MDR1 vagy P-glikoprotein) fehérjét is [233]. Az esetek egy részében az inszenzitivitás mögött genetikai tényezők figyelhetők meg. A leggyakrabban tanulmányozott GR egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) közül az ER22/23EK, TthIII és a GR-9 β csökkent, míg az N363S és a BclI fokozott glükokortikoid-érzékenységgel járnak. Ezek közül IBD-ben azonban eddig csak a BclI esetében sikerült összefüggést találni a glükokortikoid-reszponzivitással [233]. Ezen kívül a GR kofaktor *FKBP1*, a *MDR1*, a gyulladásos mediátor *NALP1* és a *TNF α* génekben sikerült olyan SNP-ket azonosítani, melyek hozzájárulhatnak a szteroid-rezisztencia kialakulásához [233–235]. A megváltozott lokális glükokortikoid-egyensúly is hozzájárulhat a szteroid-rezisztencia kialakulásához [140]. A szöveti GR α receptor mennyisége is jól korrelált UC betegekben a glükokortikoid terápia eredményességével [236]. Több tanulmány az elégtelen glükokortikoid hatás hátterében a GR β megnövekedett expresszióját mutatta ki [200,201,230,236].

Szteroid-inszenzitivitást okozhat a proinflammatorikus mediátorok túlzottan magas szintje is. Számos *in vitro* tanulmány támasztja alá, hogy az emelkedett IL-1, IL-2, IL4, TNF α és AP1 szintek képesek meggátolni a normális GR α funkciót [233]. A MDR1 protein fontos szerepet játszik a gyógyszerek sejtekből történő aktív kiválasztásában. Glükokortikoidok iránt rezisztens betegek

keringő limfocitáiban fokozott *MDR1* expresszió mutatható ki, ráadásul az MDR1 protein gátlása csökkenti a kortizol sejtekből történő kipumpálását a T-limfocitákban és epithel sejtekben [230,233].

II.3.7. A glükokortikoidok szerepe a cirkadián óra szabályozásában

A cirkadián ritmus szabályozó rendszerének felderítésére az 1950-es évektől kezdve számos állatkísérletet végeztek, majd az 1971-ben ecetmuslicákban (*Drosophila melanogaster*) sikerült feltárni az első cirkadián óra szabályozásában részt vevő géneket is [237,238].

Emlősökben a cirkadián óra szerkezetileg két alegységre, *központi és perifériás cirkadián órára* osztható. A központi cirkadián óra a hipotalamusz szuprakiazmatikus magjában (SCN) helyezkedik el, ahová a retina ganglionsejtjeiből induló tractus retinohypothalamicus, mely a fény-sötétség váltakozásáról szolgáltat információt. Más idegpályákon keresztül táplálkozási, hőmérsékleti ingerek, sőt direkt vagy indirekt módon egyes szteroid hormonok is képesek módosítani az SCN működését [239–241]. Fény hatására az SCN sejtjeiben egységes, szinkronizált válasz jön létre, így a külső információ továbbításával az SCN-ből kiinduló idegpályákon keresztül, illetve neuroendokrin mediátorok (GABA, AVP, VIP, PK2) elválasztásával más agyterületek és a belső szervek cirkadián működését szabályozza [240]. Az SCN további fontos szerepe, hogy a tobozmirigyhez futó idegpályákon keresztül az „alváshormonnak” is nevezett melatonin elválasztást is szabályozza [240]. Központi szabályozás hiányában az egyes szövetek cirkadián órái egymáshoz képest fokozatosan eltolódnak, és a szervezet deszinkronizálódik [240,242]. Állatkísérletekben a szimpatikus vagy paraszimpatikus idegrostok átvágása esetén megfigyelték többek között a tüdő-, máj- és mellékvese működés ritmusának megváltozását [243–245]. Összefoglalva tehát a központi cirkadián óra a külső és belső információk integrációjával szinkronizálja és vezérli az egész szervezet napi ritmusát.

A *perifériás cirkadián óra* a legtöbb szervünkben megtalálható, az SCN-től függetlenül is önálló működésre képes rendszer, amely számos, szövetspecifikus folyamat ritmikus szabályozását végzi [240,246,247]. Érdekes módon az egyes szervekből kivett szövettenyészetekben is megfigyelhető néhány napig a cirkadián óra gének expressziójának egyre csökkenő amplitúdóval történő oszcillációja, ami arra utal, hogy egyes sejtekben továbbra is funkcionális marad a cirkadián óra, azonban a megfelelő szinkronizáló hatás hiányában az egyes sejtek fázisa egymáshoz képest fokozatosan eltolódik, amelyek hatása eredményeként végül kioltják egymás hatását [242,248,249].

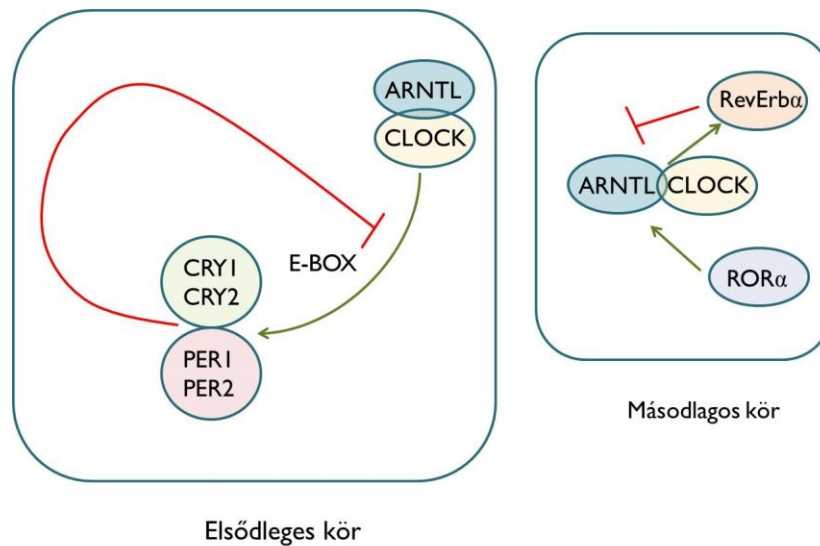
Meglepő módon még egyes daganatos sejtvonalakban is újra indukálható a cirkadián óra, ha a sejteket szinkronizáljuk szérumentes tápfolyadékban tartva őket (szérum sokk) vagy glükokortikoidokkal történő kezeléssel [250,251].

Számos hormon is közvetlenül szabályozhatja a cirkadián órát: a nemi hormonok közül az ösztadiol a méhben, a tesztoszteron a prosztatában szabályozza óragének transzkripcióját [252,253]. A kortizol elválasztás cirkadián mintázata jól ismert, így nem meglepő, hogy a hormonok közül a legnagyobb figyelmet a glükokortikoidok kapták. Mellékvese-eltávolításon átesett állatokban a vesében, a májban, corneában és az agyalapi mirigyben is megváltozott az óragének expressziója, ezáltal az egyes szervekben működő perifériás órák egymáshoz képest eltolódtak [254]. SCN-eltávolításon átesett állatokban a glükokortikoidok ismét szinkronizálták a májban a korábban ritmikus expressziót mutató transzkriptumokat [255]. Érdekes módon még fibroblaszt sejtvonalban is újra indukálható volt a cirkadián óra dexametazon hatására [251]. Újabb kutatások már emberekben is kimutatták, hogy a kívülről adott glükokortikoidok képesek szabályozni a perifériás óra működését [256].

II.3.8. A cirkadián óra molekuláris mechanizmusa

A cirkadián óra molekuláris szerkezetének magját az úgynevezett *óragének*, két egymáshoz kapcsolódó és kölcsönhatásban álló szabályozó köre alkotja. Az elsődleges visszacsatoló körben a Period-Arnt-Single (PAS) transzkripciós családba tartozó ARNTL (BMAL1) és CLOCK fehérjék egymással heterodimert alkotva serkentik az ún. E-box szabályozó elemekkel rendelkező Period (*PER1*, *PER2*, *PER3*) és Cryptochrome (*CRY1*, *CRY2*) gének átíródását. Ugyanakkor a PER és CRY fehérjék a sejtmagba transzlokálódva az ARNTL:CLOCK heterodimer gátlásán keresztül megakadályozzák saját transzkripciójukat. A másodlagos szabályozó körben az ARNTL:CLOCK heterodimer serkenti a *REV-ERB α* (*NR1D1*) és *ROR α* gének átíródását. Mind a *REV-ERB α* , mind a *ROR α* képes kapcsolódni az *ARNTL* promoterében található retinsav-kapcsolt árva receptor reszponzív szekvenciákhoz (ROREs), ugyanakkor míg a *ROR α* pozitívan szabályozza az *ARNTL* transzkripcióját, addig a *REV-ERB α* gátolja azt [257] (**10. ábra**).

A transzkripciós visszacsatolási folyamatok mellett számos poszt-transzlációs mechanizmus, például foszforiláció, ubikvitinálás, valamint a legújabb kutatások alapján, a rövid szabályozó RNS-ek, az ún. mikro-RNS-ek is nélkülözhetetlenek a cirkadián óra szabályozásában [258,259]. Mindezek együttes eredményeként a cirkadián órát alkotó gének kifejeződésének megközelítőleg 24 órás ritmikus oszcillációja jön létre.



10. ábra A cirkadián óra molekuláris szerkezete. Rövidítések: ARNTL, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like; CLOCK, circadian locomotor clock output cycles kaput protein; CRY1,2, cryptochrome 1,2; REV-ERB α , nukleáris receptor REV-ERB α ; ROR α , RAR-kapcsolt árva receptor A; E-box, enhancer box [260]

II.3.9. A cirkadián óra klinikai jelentősége

Számos tanulmány igazolta, hogy emberekben a megváltozott cirkadián ritmus (éjszakai műszak, rendszertelen táplálkozás, jet-lag) következtében fokozott a 2-es típusú cukorbetegség, az elhízás, a szív- és érrendszeri megbetegedések, valamint egyes daganatok kialakulásának kockázata [261–264]. A szokásostól 12 órával eltérő alvási és étkezési mintázat már rövid távon is kimutatható élettani és metabolikus következményekkel jár. Megemelkedik az átlagos artériás középnyomás és a posztprandiális glükóz szint, valamint megfordul a kortizol-elválasztás napi ritmusa. További fontos következmény, hogy csökken a szervezetben a leptin szintje, mely az éhségérzet fokozásán keresztül elhízáshoz vezethet [265]. Az alvásmegvonás következményei molekuláris szinten is kimutathatóak. A kísérletben részt vevő emberek teljes véréből izolált mintákban megváltozott a cirkadián óragének és egyes kromatin-módosulásban, gyulladásos- és immunválaszban, valamint a géntranszkripció szabályozásában szerepet játszó gének expressziója [266].

A cirkadián óra szövetspecifikus módon a transzkriptumok közel 10%-át képes szabályozni [267]. Számos állatkísérlet történt az utóbbi években annak érdekében, hogy felderítsék a cirkadián óragének szerepét az egyes szervek szabályozásában. Állatkísérletek alapján a mellékvesekéregben található cirkadián óra fontos szerepet tölt be a glükokortikoidok diurnális ritmusának kialakításában. Per2/Cry1 knock out egerekben megszűnt a kortikoszteroidok diurnális ritmusa, és a mellékvese érzéketlenné vált az ACTH-val szemben [268]. A cirkadián óra azonban a szteroidszintézis sebességének meghatározó lépését végző StAR enzim transzkripciójának

szabályozásával közvetlenül is befolyásolja a kortikoszteroidok bioszintézisét [269]. Cry1/2 deficiens egerekben hiperaldoszteronizmus és só-dependens módon magas vérnyomás betegség alakult ki [270]. A májban az egyes óragének kiütésével csökken az inzulin-érzékenység, az epesav szintézis, valamint megváltozott a glükóz homeosztázis [271,272]. A hasnyálmirigyben Arntl knock out egerekben β -sejt diszfunkció és cukorbetegség alakult ki [273].

Fontos megemlíteni, hogy az óragének a *sejtciklus* szabályozásán keresztül egyes daganatok kialakulásában is szerepet játszhatnak [264,274]. Állatkísérletekben irradiációt követően *Per2* mutáns egerek fokozott hajlamot mutattak tumorok kialakulására. Ennek hátterében a mutáns egerekben a sejtciklus és tumorszuppresszió szabályozásában részt vevő Ciklin D1, Ciklin A, Mdm-2 és Gadd45a gének szabályozásának zavarát sikerült azonosítani [275]. Mindezen kívül klinikai vizsgálatok során emlő, vastagbél, tüdő, valamint egyes vérképzőszervi daganatokban is kimutatták a Period gének megváltozott expresszióját [276].

II.4. SPORADIKUS HIPOFÍZIS DAGANATOK

II.4.1. Definíció, gyakoriság

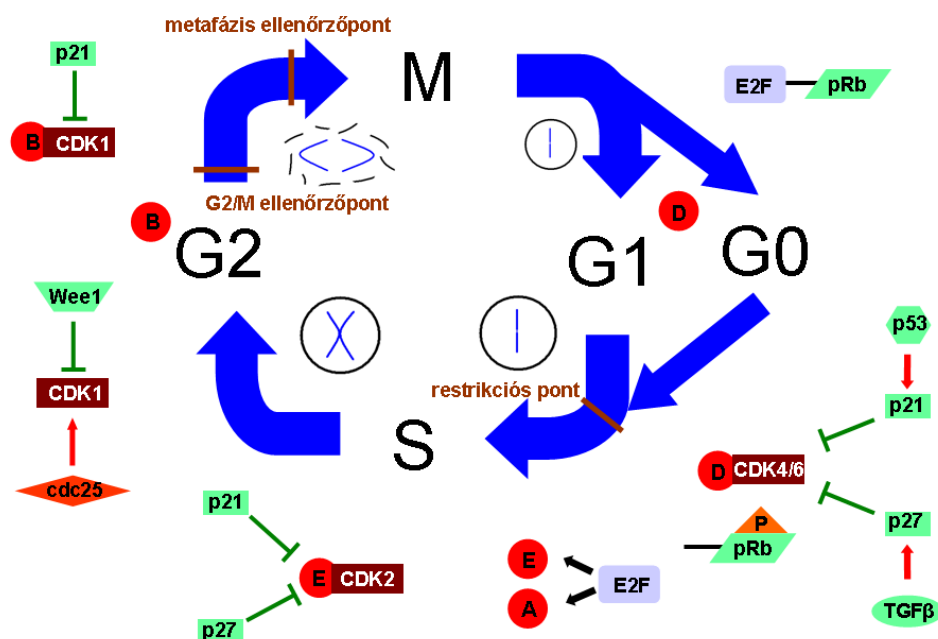
A hipofízis adenomák az agytumороk 10-25%-át képezve a leggyakoribb daganattípusok közé tartoznak gyakoriságuk 1:909-1:1818 [277]. Általában jóindulatú daganatok, de jelentős morbiditást eredményeznek az endokrin rendszerre gyakorolt és a térfoglaló hatásukból adódóan. Leggyakrabban, az esetek mintegy felében a daganat prolaktint termel (prolactinoma), de a hormonálisan inaktív, nem-funkcionáló daganatok (NFPA: non functioning pituitary adenoma) az összes adenoma mintegy 30%-át teszi ki. Gyakoriságban ezt követik a növekedési hormont (GH) termelő adenomák (15-20%), az ACTH-t termelő kortikotrop adenomák (5-10%), és a rendkívül ritka TSH-t termelő thyreotrop adenomák (1%). A gonadotropint termelő és szekretáló adenoma ritka jelenség, patobiokémiai vizsgálatok alapján azonban a klinikailag nem-funkcionáló adenomák döntő többsége (ha nem mind) hormont nem szekretáló gonadotrop adenomának tekinthető [278].

A daganatok kialakulásának pathomechanizmusát tekintve két szemlélet áll fenn, a kifejlődésük hátterében mind hipotalamikus (primer neuroszekréciós zavar), mind hipofizeális okokat (hipofízis sejtek primer zavara) feltételeznek. A *hipotalamikus elmélet* alapján a GHRH túltermelés GH-t termelő adenoma, a dopamin csökkent szekréciója pedig prolactinoma kialakulását okozhatja. Valószínűnek tartják, hogy a primer, hipofizeális sejtekben megjelenő defektus kialakulása után a daganatos sejtklónok növekedésében szerepet játszanak a hipotalamusz felől érkező stimulusok. A *hipofizeális sejtek primer zavara* elmélet alapján a primer molekuláris biológiai elváltozás magában a hipofízis alkotó sejtben alakul ki. A hipotézis mellett szól, hogy a legtöbb sporadikusan előforduló adenoma monoklonális [279,280].

II.4.2. Genetikai és epigenetikai eltérések hipofízis daganatokban

A sporadikus adenomákban *génmutáció* a GH-t termelő daganatok 30-40 %-ában jelen levő GNAS-mutációtól eltekintve ritkán igazolható [281].

A génmutációkkal ellentétben *epigenetikus* folyamatok gyakrabban igazolhatóak hipofízis adenomákban. Ezek közül jelentős a főként a sejtciklust szabályozó gének *hipermetilációja*, ami fontos tumorsuppresszor gének inaktivációjához [282,283] (11. ábra).



11. ábra – A sejtciklus szabályozása – Fekete vonalak a sejtmaghártyát, kék vonalak az örökítőanyagot, piros körök a ciklineket, barna téglalapok a CDK-kat, zöld téglalapok a CDKi-kat jelképezik. A piros nyilak aktivációt, míg a zöld T-alakú vonalak inhibíciót szimbolizálnak. A barna vonalak az egyes ellenőrzőpontokat jelölik.

A retinoblastoma fehérje (pRb) és számos ciklin dependens kináz inhibitor (CDKI) csökkent expresszióját igazolták hipofízis adenomákban promóter metiláció miatt. A Ciklin D-Cdk4/6 komplexet gátló Ink4 családba tartozó gátló fehérjék ($p15^{\text{Ink4b}}$, $p16^{\text{Ink4a}}$, $p18^{\text{Ink4c}}$) és a Ciklin E/Cdk2 komplexet gátló Kip/Cip család ($p21^{\text{Waf1/Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1}}$, $p57^{\text{Kip4}}$) egyes tagjai között is viszonylag gyakori a promóter metiláció (12. táblázat). Mindkét komplex aktivációja végül a pRb foszforilációjához (inaktiválásához) vezet; ezt tekintik a restríciós ellenőrző ('R') pontnak, amelyet átlépve elindul a sejtosztódás (lásd 1. ábra). A $p27^{\text{Kip1}}$ fehérje esetében a csökkent expressziót corticotrop adenomákban és carcinomákban nem a metiláció, hanem a JAB1 által mediált fokozott degradáció okozza [284].

Nem közvetlenül, de a sejtciklust befolyásolják a *MEG3A* és a *GADD45γ* gének is, amelyek mRNS expressziója szintén epigenetikus szabályozás következtében alacsonyabb az adenomákban.

A *MEG3A* gén minden normális hipofízis sejtben expresszálódik, azonban a gonadotrop eredetű, klinikailag nem-funkcionáló adenomákban a hipermetiláció eredményeképpen expressziója megszűnik. A gén terméke fehérjét nem kódoló RNS molekula, amely a p53 transzaktivációját segíti elő, így rendkívül erős sejtproliferációt gátló hatása van számos humán tumorsejtvonalban. A GADD45 γ csökkent expresszióját is CpG szigetek hipermetilációja okozza nem-funkcionáló, GH-t és PRL-t termelő adenomákban. Környezeti stresszfactorok (pl. UV sugárzás) hatására kapcsolódik az MTK1 (= MEKK4) kinázhoz, amelyen keresztül a p38, JNK útvonalakat aktiválja, így G2/M arrest-hez vezet. Daganatos sejtvonalakon hatékony proliferáció gátló hatást fejt ki [285].

Az apoptózis szabályozásában szerepet játszó fehérjéket kódoló gének közül a *DAPK* hiányzó expresszióját írták le deléción vagy hipermetiláció következményeként invazív adenomákban, a *PTAG* gén promóter metiláció miatti csökkent vagy hiányzó expresszióját a hypophysis daganatok többségében, a *ZAC1* csökkent expresszióját pedig elsősorban nem-funkcionáló adenomákban igazolták mRNS és fehérje szinten egyaránt. Ez a cink-ujj fehérje a nukleáris receptorok kofaktora lehet, kötődhet a CBP/p300-hoz és a p160-hoz, de mint a p53 koaktivátora szerepet játszik az Apaf-1 proapoptotikus gén szabályozásában is [285].

A metiláció miatt funkcióvesztés mellett számos gén *fokozott expresszióját* is igazolták hipofízis daganatokban. A *PTTG* gén tűnik a legjelentősebb tényezőnek hiszen a daganatok típusától függetlenül az esetek kb 90%-ában fokozott expressziót mutat [286]. A PTTG-nek szerepe lehet mind a daganatok kialakulásában, mind pedig a progresszióban, *in vivo* és *in vitro* kísérletek is igazolták transzformációt okozó hatását. A PTTG fehérje a human securin-szerű fehérjék családjába tartozik, egyéb nukleáris separin fehérjékhez asszociálódva gátolja a testvérkromatidák szétválását a metafázisban, így jelentős szerepe van a mitózis folyamatában. Kimutatták, hogy a PTTG transzaktivációs doménjét a MAPK kaskád tagjai foszforilációval aktiválják ez által nukleáris transzlokációját okozzák [287]. Serkenti a bFGF expresszióját, amely egy rendkívül potens angiogenetikus és mitogén faktor valamint felelős lehet az adenomákban megjelenő aneuploidizmus kialakulásáért is gátolva a testvérkromatidák szétválását [288,289]. Fokozott expressziója esetén megszakad a testvérkromatidák szétválása (kromatidavesztés, kromatidatöbblet, aneuploiditás), az így kialakuló genetikai instabilitás protoonkogén aktivációhoz és tumorsuppresszor gén LOH-hoz vezethet [290,291]. Ezen kívül a PTTG stimulálja a FGF2 (basicFGF, bFGF) expressziót, amelyen keresztül szabályozza az endothel VEGF expresszióját [286]. Kapcsolatba lép az Sp1 transzkripciós faktoral, amellyel közösen szabályozzák a sejtciklus G1/S átmenetét. Az Sp1-en keresztül elnyomja a p21 expresszióját, így szabályozza a sejtproliferációt és sejtosztódást. A proliferációs aktivitás és a recidív állapot markerének tartják. *PTTG* mutációt sporadikus adenomákban eddig nem találtak [292].

A sejtciklusban részt vevő ciklinek és egyéb fehérjék eltérő expressziója, melyek végső soron a sejtciklust befolyásolják, szintén szerepet játszhat a hipofízis adenomák kialakulásában, bár sok esetben a fokozott transzkripcióhoz vezető pontos mechanizmus nem ismert. A ciklin D1 és ciklin D3 NFPA-k esetében, a ciklin E a corticotrop adenomák nagy százalékában, míg a ciklin B a HMGA2-vel összefüggésben a prolactinomákban mutat fokozott expressziót [293,294]. A HMGA2 a kromatin szerkezetét befolyásolja és elősegíti a transzkripciót. Jelentős szerepet játszik az embrionális fejlődésben, expressziója is ekkor a legmagasabb, míg a felnőtt szövetekben szinte alig, vagy egyáltalán nem fejeződik ki. Részt vesz a sejtprolifерáció, a differenciálódás, az apoptózis folyamatában és számos daganat (hasnyálmirigy, pajzsmirigy, emlő, vastagbél, prosztatata stb.) kialakulásában [295–297]. Transzgén egerekben fokozott expressziója GH-t és PRL-t szekretáló adenoma kialakulását okozta [298]. NFPA-ban szerepe nem egyértelmű; egy tanulmány 18 vizsgált szövetből 12-ben emelkedett kifejeződését igazolta, de mindössze 2 esetben azonosítottak génamplifikációt vagy génátrendeződést [299]. Expressziója kifejezett az invazív, malignusabb daganatokban [300].

12. táblázat. A sporadikus hipofízis adenomák patogenezisében részt vevő fontosabb gének és defekusok [301]

Gén	Eltérés
RAS	Szomatikus aktiváló mutáció carcinomában és invazív tumorokban
pRb (RB1)	Promóter hipermetiláció az adenomák 28,6%-ában (12/42) 35%-ában (12/34) Vizsgált tumorok 90%-a (18/20) expresszáta a pRb-t, a nem expresszálók 60%-ában (6/10) a promóter régiója metilált Rb lókuszt érintő LOH invazív és malignus daganatok 100%-ában
p53	Szomatikus inaktiváló mutáció és túlzott expresszió carcinomákban
PTTG	Fokozott expressziója az adenomák 90%-ában
Pdt-FGFR4	Fokozottan expresszálódik az adenomák 42-60%-ában, kifejezett expresszió az invazív adenomákra jellemző
FGF2	Fokozottan expresszálódik a hypophysis daganatokban, kifejezetten az agresszív adenomákban
BMP4	Fokozottan expresszálódik prolactinomában
p14(ARF)	Promóter hipermetiláció az adenomák 6%-ában (2/34)
p15INK4b (CDKN2B)	Promóter hipermetiláció az adenomák 32%-ában (11/34) és 35,7%-ában (15/42)
p16INK4a (CDKN2A)	Promóter hipermetiláció az adenomák 59%-ában (20/34) és 71,4%-ában (30/42)
p18INK4c (CDKN2C)	Promóter hipermetiláció az adenomák 39,5%-ában
p21Waf1/Cip1 (CDKN1A)	Promóter hipermetiláció az adenomák 3%-ában (1/34) Csökkent expresszió a nem-funkcionáló adenomák 71%-ában Fokozott expresszió a hormontermelő adenomák 77%-ában és a GH termelő adenomák 92%-ában
p27Kip1 (CDKN1B)	Promóter hipermetiláció az adenomák 0%-ában (0/34) Csökkent expresszió az adenomákban, kifejezetten a corticotrop adenomákban Az adenomák 75 %-ában csökkent expresszió
Cyclin D1 (CCND1)	Fokozott expresszió az adenomák 49%-ában Allél kiegyensúlyazatlanság az invazív daganatok 38%-ában (11/29), a nem invazív daganatok 13%-ában (4/31)
Cyclin D3 (CCND3)	Fokozott expresszió az adenomák 68%-ában
Cyclin E (CCNE)	Fokozott expresszió a corticotrop adenomák 37%-ában
Cyclin A (CCNA1)	Fokozott expresszió hypophysis adenomákban
GADD45 γ	Csökkent expresszió az adenomák 58-67%-ában hipermetiláció miatt
MEG3A	Expressziója megszűnik a nem-funkcionáló adenomák 92,8%-ában promóter hipermetiláció miatt
DAPK	Expressziója megszűnik az invazív adenomák 59%-ában (10/17), melyet 45%-ban hipermetiláció, 36%-ban homozigóta delécia okoz
PTAG	Az adenomák 79%-a (30/38) elveszíti a PTAG expressziót, 20 %-ban hipermetiláció miatt
ZAC	Csökkent vagy hiányzó expresszió nem-funkcionáló adenomákban
HMGA	Fokozott expresszió leggyakrabban prolactinomában (génamplifikáció)
JAB1	Fokozott expresszió carcinomákban

II.4.3. Jelátviteli utak eltérései hipofízis adenomákban

A molekuláris biológiai módszerek (array-k és nagy áteresztőképességű vizsgálatok) fejlődésével és a bioinformatika egyre nagyobb térnyerésével a hipofízis adenomákkal kapcsolatban is mindinkább a jelátviteli utak érintettsége kerül a kutatások középpontjába. Ezekben a daganatokban a MAPK kaszkád és PI3K/Akt/mTor útvonalak túlzott aktiválódását mutatták ki [278]. A PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) egy nem-receptor tirozin kináz, melyet a már említett tirozin kináz receptorok (pl.: EGFR, VEGFR) mellett G-fehérjék, integrinek is aktiválhatnak (Ras mutáció esetén receptortól függetlenül aktiválódik). A PI3K fő célpontja a protein kináz B (PKB) vagy az AKT. Az AKT aktivációja egy sor fehérje foszforilációjához vezet, melyek szerepet játszanak a sejtek növekedésében, túlélésében és a sejtciklusban, például az AKT kikapcsolja a proapoptotikus és sejtciklusgátlást okozó jeleket (FOXO3A, FOXO4, FOXO1, BAD, GSK β ,

kaszpáz-9, PAR4), vagy aktiválja az antiapoptotikus I κ B kinázt és MDM2-t [302]. Direkt és indirekt (TSC komplexen és RHEB-en keresztül /RHEB: Ras homolog enriched in brain, TSC2: tuberin/) úton aktiválja a szerin-treonin kináz mTOR-t. Az mTOR kétféle funkciót tölt be a vele komplexet alkotó fehérjétől függően: a rictor-fehérjével komplexben növekedési faktorok hatását közvetíti az AKT felé, a raptorral komplexben pedig a fehérjeszintézisre hat. Az mTOR aktiváció fokozott proliferációhoz vezet a 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein1) gátlása és a riboszómális S6 kináz (p70S6K) aktiválása által. Intenzívebb működése fokozza a sejtproliferációt és a növekedést serkentő fehérjék (ciklin D, myc, VEGF) termelését.

Hipofízis adenomákban, különösen NFPA-ban az Akt molekula fokozott expresszióját (mRNS és fehérje szinten) és aktivált állapotát (nagyobb arányban jelenlevő aktív, foszforilált forma) találták [303]. Az AKT túlműködése a p27^{Kip1} fokozott foszforilációjához vezet, amely megakadályozza annak a sejtmagba történő transzportját. Ezért hipofízis adenomákban a sejtciklus egyes eltérései másodlagosnak tekinthetők a fokozott AKT jelátvitel következtében. Az mTOR útvonal viszonylagos érintettsége ellen szól, hogy önmagában sem a TSC, sem az mTOR expressziója hipofízis daganatokban nem tért el a normális szövethez képest. Az Akt túlaktivációja ezen útvonalak mellett a GSK β -n keresztül a β -katenin jelátvitellel is kapcsolatban van, amit viszont már összefüggésbe hoztak a hipofízis adenomák patogenezisével [304,305].

PI3K/Akt/mTor útvonal mellett mitogén hatásra a Ras (kis GTPáz) fehérjék szintén aktiválódnak. A Ras fehérje leginkább Raf (MAPKKK, mitogén aktivált protein kináz kináz kináz) kinázon keresztül aktiválódik, de a PI3K felé is továbbít jelet, így a két útvonal között „crosstalk” is fennáll. A Raf aktiválja a MEK-et (MAPKK), amely foszforilált állapotában aktiválja az ERK-et (MAPK). Az ERK a sejtmagba transzlokálódik és transzkripciósfaktorokat aktivál, olyan gének expresszióját befolyásolva, amelyek által elősegíti a növekedést és mitózist (p70S6K, c-myc, c-Fos, Elk, ciklin D) [306]. RAS mutációk nem jellemzőek hipofízis adenomákra (ellentétben más daganatokkal, ahol gyakori elváltozások), azonban mRNS- és fehérjeszinten is fokozott RAS expressziót igazoltak. A MAPK kaszkád többi elemét is (MEK1/2, ERK1/2) nagy mértékben foszforilálnak (túlaktiválnak) találták hipofízis adenomákban, ami a ciklin D1 expresszió növekedéséhez vezet [307–309].

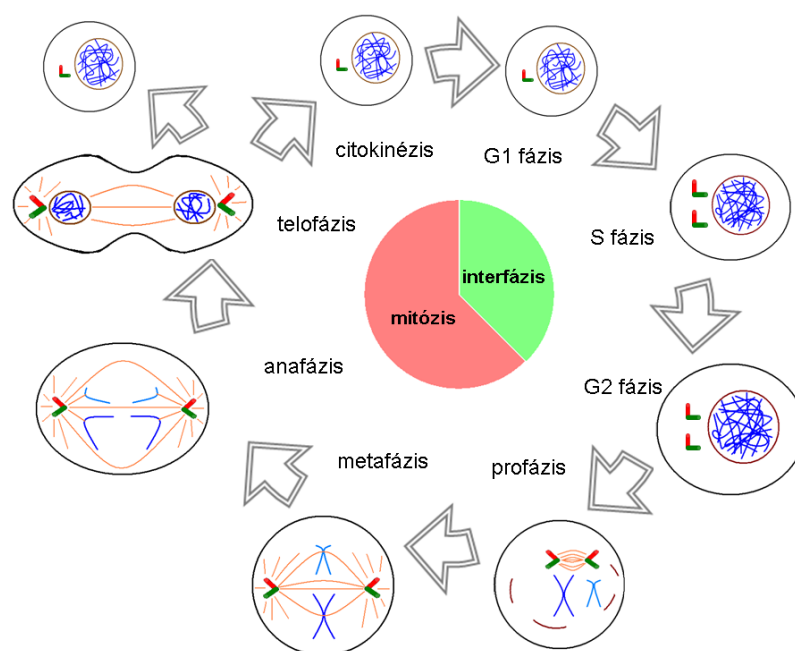
Újabb array alapú kísérletek eredményei alapján felvetik, hogy a fejlődésben kiemelkedő szerepet játszó WNT és Notch jelátviteli útvonalak is aktiválódnak és szerepet játszanak a hipofízis daganatok, elsősorban a nem-funkcionáló adenomák növekedésében [310]. A WNT-ken keresztül három fő jelátvitel valósul meg: a WNT- β -katenin, vagy kanonikus út; a WNT-JNK és a WNT-kalcium útvonal. A jelátvitelre – más útvonalakra is jellemzően – a szövetspecifitás jellemző; a különböző ligandumok a sejtkontextustól függően különböző jelátvitelt indíthatnak. Hipofízis esetén a WNT4a a Rathke tasakban expresszálódik az embrionális fejlődés alatt. WNT4-/-

egerekben csökken a somatotrop sejtpopuláció, az α -alegység és a TSH mennyisége. A WNT5a funkció kiütése transzgén egerekben neonatalis letalitáshoz vezet [311]. A kanonikus útvonal a β -kateninen keresztül valósul meg és feltételezik, hogy nagyobb szerepet játszik a daganatok kialakulásában (pl.: vastagbélrák), mint a nem-kanonikus jelátvitel. A WNT inhibitorok közül az SFRP család tagjai közül hipofízis adenomákban az SFRP2-t, SFRP4-et, WIF1-et, DKK2-t és DKK3-t csökkent mennyiségűnek találták [305,312–314], gyakran hipermetiláció következtében. Bár az SFRP1 a WNT inhibitorok közé tartozik, bizonyos körülmények között anti-apoptotikus hatással bír [315] és a fenti közlemények adatai alapján hipofízis adenomákban fokozottan expresszálódik. Az útvonal célgénjeit vizsgálva hipofízis adenomákban megnövekedett ciklin D1, PITX2 és MYC szintet találtak, valamint a p21 a GH termelő adenomákban fokozott expressziót mutatott [310,316,317]. Összességében tehát a célgének expressziója is az útvonal túlaktivált állapotát támasztja alá.

A Notch útvonal, amely ugyancsak az embrionális fejlődésben játszik szerepet, szintén fokozottan aktivált nem-funkcionáló hipofízis adenomákban. A ligandum kötődése után proteolízis révén a receptor intracelluláris része a sejtmagba transzlokálódik és különböző gének expresszióját szabályozza. Ennek az intracelluláris doménnek a konstitutív expressziója transzgén állatokban [318] agresszív T-sejtes neopláziát okoz. A Notch3 indirekt módon az ASCL-en keresztül a DLK1 expresszióját szabályozza [319]. A két gén expressziója között negatív korreláció áll fenn, arányuk alapján elkülönítenek magas DLK1/alacsony Notch3 expressziójú és magas Notch3/alacsony DLK1 expressziójú daganatokat, amelyek a differenciáltsági állapottal vannak összefüggésben [320]. Az NFPA-ban az előbbi konstelláció áll fenn, ami alapján valószínűsítik, hogy ezek a daganatok vagy nem-differenciált sejtekből alakulnak ki, vagy a daganatfejlődés során de-differenciálódnak (Dlk expresszióról Notch3 expresszióra váltanak), amelyet az alacsony Pit1 expresszió is igazol [310]. Ez felveti azt a kérdést, hogy az eddig gyógyszeresen nem kezelhető nem-funkcionáló adenomák esetében az Alzheimer-kór kezelésében használt gamma szekretáz gátló (Notch jelátvitelt gátló) gyógyszerek hatásosak lehetnek-e.

II.5. SEJTCIKLUS

Az eukarióta sejtek ismétlődő növekedési és osztódási folyamatát, amely során örökítőanyaguk megkettőződését követően – optimális esetben – két leánysejtre osztódnak, sejtciklusnak nevezzük. A sejtciklus egy szigorúan szabályozott folyamat, melynek során az egymást követő egyes fázisok felkészítik a sejtet a sikeres megkettőződésre, ami a növekedés, fejlődés és differenciálódás előfeltétele (**11. és 12. ábra**).



12. ábra – A sejtciklus sematikus ábrázolása – Fekete ellipszisek és körök a sejtmembránt, barna körök és vonalak a sejtmembránt, piros-zöld merőleges hengerek a centroszómát, narancssárga vonalak a mikrotubulusokat, kék vonalak az örökítőanyag különböző állapotait (eukromatin, heterokromatin, kromoszóma) jelképezik. Az ábra bővebb kifejtése a szövegben található [321].

Az osztódást követően létrejött leánysejt először egy nyugalmi, G1 (growth – növekedés 1) fázisba kerül, majd a környezetéből származó tápanyagok és mitogén szignálok hatására a restrikciós pontot átlépve elköteleződik az osztódás irányában és belép az S (szintézis) fázisba [322]. Mitogén szignálok és megfelelő tápanyagok hiányában a sejt egy osztódási potenciáljától időlegesen megfosztott G0 fázisba kerül, ahonnan a környezeti tényezők változásának következtében visszaléphet G1 fázisba. Az S fázis során történik az örökítőanyag (deoxiribonukleinsav – DNS) és a centroszóma megkettőződése is ekkor történik. A centroszóma egy, nyugalmi sejtben a sejtmag közelében lévő organelum, mely két merőlegesen kapcsolódó centriólumból és az azt körülvevő, számos fehérje alkotta pericentrioláris anyagból (pericentriolar material – PCM) áll. A centroszómák megkettőződése és optimális működése egy, a sejtciklussal összehangolt centroszóma ciklusnak nevezett folyamat révén szabályozódik [323]. Az örökítőanyag sikeres megkettőződését követően a sejt G2 fázisba kerül, melynek során felkészül a kettéosztódásra. A G1, S és G2 fázisokat, melyek során az örökítőanyag – részlegesen – transzkripcióra alkalmas, hozzáférhető állapotban van (eukromatin) összefoglalóan interfázisnak nevezzük. Az interfázist követően a sejt a mitózis folyamatába lép. Ennek során a profázisban a sejtmembránhártya integritása megszűnik, az örökítőanyag kromoszómákba szerveződik. A centroszómák egymástól elkezdenek távolodni a sejt két ellentétes pólusa felé, közöttük kialakul a mitotikus orsó. A centroszómákhoz kapcsolódó mikrotubulusok egy része a két centroszóma

távolodását szolgálja (poláris vagy nem-kinetokór mikrotubulusok) [324]. Egy másik része a kromoszómák centromér régiójához csatlakozó kinetokór komplexhez kötődik (kinetokór mikrotubulusok) [325], míg egy harmadik csoportjuk a centroszómából csillagszerűen kisugározva a centroszómák helybentartásában játszik szerepet (asztrális mikrotubulusok) [326]. A metafázis során a mitotikus orsó kifejlődik, a kromoszómák a poláris és kinetokór mikrotubulusok segítségével az osztódás egyenlítői síkjában felsorakoznak. Az anafázis során a mitotikus orsó működése következtében a kromoszómák a megfelelő oldali centroszóma felé közelednek. A telofázis során kezd kialakulni az új sejtmagmembrán, a szigorúan szervezett kromoszómák elkezdnek hetero- és eukromatinná alakulni. Ezt követően, a citokinézis lépésében a két citoplaszma is különválik és a két leánysejt önálló működésbe kezd.

II.5.1. A sejtciklus szabályozása

A sejtciklus folyamatainak pontos, összehangolt működése egy szigorú szabályozás következménye, amelyben mind transzkripció, transláció (sejtciklusdependens expressziót mutató fehérjék) és poszt-transzláció (aktiváló és deaktiváló foszforilációk és defoszforilációk) valamint lebomlási folyamatok is érintettek. A szabályozás alapjainak leírásáért 2001-ben Leland H. Hartwell amerikai, Tim Hunt és Paul Nurse brit kutatókat orvosi-élettani Nobel-díjjal jutalmazták [327–330]. A szabályozás kiemelten fontos faktorai a csupán bizonyos fázisokban expresszáldó (sejtciklusdependens kifejezést mutató) ciklinek amelyek ciklindependens kinázok (CDK) működését regulálják (12. ábra). Bár a sejtciklus szabályozásával kapcsolatos vizsgálatok nagy része élesztőgombákban történt és történik, munkánkban a különböző faktorok humán homológjait tárgyaljuk.

Exogén és endogén mitogén szignálok hatására intracellulárisan fokozódik a D-típusú ciklinek expressziója, melyek a CDK4 és CDK6-hoz kötődve foszforilálják a retinoblasztóma (pRb) és retinoblasztómához hasonló (p107, p130) proteineket [331,332]. A hiperfoszforilálás hatására a pRb megszünteti gátló kapcsolatát az E2F transzkripció faktor-család tagjaival (E2F1-E2F8), melyek aktívvá válva iniciálják az S fázishoz szükséges faktorok (pl.: ciklin A, ciklin E) transzkripcióját [333]. A ciklin E-CDK2 komplex az S fázisba lépést, míg a ciklin A-CDK2 komplex az S fázis további szakaszait regulálja [334,335]. A sejtciklus során a ciklin B expressziója fokozatosan növekedik, szintje a mitózis fázisában éri el a maximumot [336]. Ekkor az – expressziójában szintén ekkor tetőző – CDK1-gyel komplexet alkotva (MPF – mitosis promoting factor) a mitózis regulálásában tölt be kulcsszerepet. A ciklin B lebomlása ugyanakkor a mitózisból való kilépés előfeltétele is [337]. Megjegyzendő, hogy újabb vizsgálatok redundánsnak vélik bizonyos CDK-k működését. Kimutatták, hogy mind a ciklin D-CDK4/6, mind a ciklin E-CDK2 komplexek nélkül végbemehet a sejtciklus [338,339] (11. ábra).

A ciklinek regulálta CDK-k működését egyéb faktorok is befolyásolják. A CDK inhibitorok (CDKi) közé tartoznak a cip/kip és az INK4a/ARF család tagjai. A cip/kip család tagjai közül a p21 és p27 proteinek számos CDK működését gátolják (2. ábra) [340]. Az INK4A/ARF lókusztól átíródó p16INK4A és a p14/p19ARF proteinek sejtciklus-inhibitorokként képesek megállítani a sejtciklus progresszióját G1, illetve G1 és G2 fázisokban [341]. A CDKi-k mellett számos más fehérje is befolyásolja a sejtciklus működését. A CDK1 aktivitását foszforilációs állapota befolyásolja [342]. A WEE1 kináz mediálta foszforilálás a fehérje Thr14 és Tyr15 aminosavain a CDK1 inaktiválásához vezet [343,344]. A CDC25 mediálta defoszforilálás ugyanakkor aktív CDK1-t eredményez, amely előfeltétele a mitózisba lépésnek [345]. Emellett a közismert tumor szuppresszor p53 indukálja a p21 expresszióját, lassítva a sejtciklus progresszióját [346]. A sejtciklus lassításának irányába hat a TGF- β (transforming growth factor- β) p27-re gyakorolt aktiváló hatása is [347].

A sejtciklus optimális működését *három ellenőrzőpont* is biztosítja. A restriktív pontot (sarjadzó élesztőben START pont) elhagyva, az eddig a pontig beérkező exogén és endogén szignálok eredőjeként köteleződik el a sejt a “minden-vagy-semmi” elve alapján az osztódás irányába. A DNS sikeres és hibátlan megkettőződése az előfeltétele a G2/M ellenőrzőpont sikeres átlépésének. Perzisztáló egyszálú DNS molekula aktiválja az ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) jelátviteli utat, ami a CHK1 (checkpoint kinase 1) aktiválásán keresztül a CDC25 foszforilálását eredményezi, ami így inaktívvá válik és képtelen a CDK1 aktiváló defoszforilálását elvégezni [348]. A DNS molekulán található kettős szálú törések (DSB – double strand break) az ATM (ataxia telangiectasia mutated) jelátvitelt aktiválja, mely a CHK2 (checkpoint kinase 2) aktiválásán és következményesen a CDC25A foszforilálásán keresztül gátolja a sejtciklus progresszióját [349]. A harmadik, ún. metafázis ellenőrzőpont a mitózis metafázisának során a kromoszómák optimális egyenlítői síkba rendezését vizsgálja. A kinetokór mikrotubulusok – optimális esetben – bipoláris erőhatást gyakorolnak a testvérkromoszómák kinetokór régióikra. Ezt a kiegyenlített feszültséget detektálja a metafázis ellenőrzőpont. Amennyiben egy kromoszóma irányában csak egy centroszóma felől létesül húzó hatás, a sejt nem lép túl a metafázis ellenőrzőponton. Kiegyenlített húzóerők esetén ugyanakkor, az APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) felszabadításán keresztül, az anafázisba lépéssel folytatódhat a mitózis [350].

II.5.2. A sejtciklus szabályozásában résztvevő molekulák prognosztikai jelentősége humán daganatokban

Általánosságban elmondható, hogy a sejtciklust hajtó ciklinek és CDK-k fokozott, míg a CDKi-k és egyéb tumor szuppresszor gének csökkent kifejeződése figyelhető meg daganatokban az ép szövetekhez képest. A **13. táblázatban** – a teljesség igénye nélkül – foglaljuk össze bizonyos

sejtciklus regulátorok (ciklinek, CDK-k, CDKi-k) daganatokban obszervált megváltozott expresszióját.

13. táblázat – A sejtciklus regulátorainak megváltozott expressziója néhány humán daganatban – Narancs háttér a daganatokban észlelt emelkedett, zöld háttér a daganatokban észlelt csökkent expressziót jelzi ép szövetekhez képest. Kék háttérrel jelöltük azokat az eseteket, ahol ellentmondásos adatok vannak a regulátor kifejeződésére [321].

regulátor csoport	regulátor	daganat
ciklinek	D ciklin	emlőrák
		vastagbél tumor
		mellékpajzsmirigy adenóma
	E ciklin	leukémia
		gyomorrák
		mellékvesekéreg-karcinóma
		tüdőrák
		hepatocelluláris karcinóma
		vastagbél tumor
	A ciklin	pajzsmirigy karcinóma
		vastagbél tumor
		emlőrák
		hepatocelluláris karcinóma
		tüdőrák
		endometrium karcinóma
	B ciklin	pajzsmirigy karcinóma
		tüdőrák
		vastagbél tumor
		endometrium karcinóma
		nyelőcsőrák
emlőrák		
CDK	CDK4	szájüregi rák
		hasnyálmirigy endokrin tumor
		tüdőrák
		nazofaringeális daganat
		endometrium karcinóma
	CDK2	endometrium karcinóma
		hasnyálmirigy karcinóma
		vastagbél tumor
		tüdőrák
	CDK1	vastagbél tumor
emlőrák		
petefészek daganat		
CDKi	p21	húgyhólyagrák
		petefészek daganat
		méhnyakrák
		vastagbél tumor
	p27	hepatocelluláris karcinóma
		prosztatarák
		emlőrák
méhnyakrák		

A sejtciklus regulátorainak megváltozott kifejeződése gyakran jól korrelál a daganat proliferációjával és sokszor adhat támpontot a daganatok prognózisára. Korai stádiumú, nem-kissejtes tüdőrákban az E ciklin expressziója jól prediktálta a metasztázis kialakulását [351]. Az A ciklin fokozott expressziója a rossz prognózis indikátorának bizonyult vastagbél tumorokban [352] és endometrium karcinómában [353]. Hasonlóan, fokozott B ciklin expresszió rossz prognózist prediktált nyelőcsőrákban [354] és nem-kissejtes tüdőrákban [355]. A CDK-k is alkalmasak bizonyos daganatokban a prognózis becslésére. A CDK1 fokozott expressziója rossz prognosztikai tényező vastagbél tumor [356], nem-kissejtes tüdőrák [357] és petefészek daganat [358] esetében. A CDK1 és CDK2 expressziója korai recidívát jelez előre emlőrák esetében [359].

A CDKi-k közé tartozó p21 prognózissal való összefüggése ellentmondásos [360,361], de a p27 expresszió ugyanakkor jó prognosztikai tényezőnek bizonyult hepatocelluláris karcinómában [362], míg a hiányzó p27 expresszió rossz prognózist prediktál vastagbél tumorban [363], emlőrákban [364] és tüdőrákban [365].

II.5.3. A sejtciklusdependens transzkripció vizsgálata

A sejtciklus transzkripció programjába azok a transzkriptok (mRNS, miRNS, stb.) és kifejeződés-változásuk tartoznak, melyek expressziója változik a sejtciklus különböző fázisaiban és ezen változásoknak biológiai relevanciájuk van. Ebbe a csoportba tartoznak az előző fejezetben tárgyalt ciklinek is [366–368].

Kezeletlen sejtenyészetekben a különböző sejtek aszinkronizáltan, a sejtciklus különböző fázisaiban vannak, így natív sejtenyészetek expressziós vizsgálatával nem tudunk betekintést nyerni a sejtciklus-dependens transzkripció programba [369]. Ehhez a sejteknek olyan csoportjai szükségesek, melyek azonos fázisokban vannak. Sejtenyészetek szinkronizálása során tápanyagok (leggyakrabban szérum) megvonásával (serum starvation) vagy különböző sejtciklus gátlók alkalmazásával (a DNS szintézis gátlók: timidin, aphidicolin, vagy a mitotikus orsó gátlók: kolhicin, nokodazol) a sejtciklus egy bizonyos pontján felfüggesztjük a sejtciklus progresszióját. A kezelés hatására a sejt ezt a pontot elérve sejtciklusát tovább nem folytathatja. Idővel a tenyészetben minden sejt ehhez a ponthoz ér, így a tenyészetben található összes sejt ciklusa szinkronizálódott. Ezután a tápanyagok a sejtek tápfolyadékába történő reintegrálásával, vagy a sejtciklus gátlók tápfolyadékból való eliminálásával a sejtek meghatározott pontról, szinkronizáltan folytathatják a sejtciklust. Ennek során a sejtenyészetből időegységenként mintát véve, a sejtciklus pillanatnyi állapotához viszonyítva, vizsgálhatóvá válik a sejtciklus-dependens transzkripció program. Ehhez nagy áteresztőképességű expressziós metodikák (pl. microarray) és ezt követően optimális bioinformatikai analízis szükséges. A különböző fázisú sejtcsoportok expressziós mintázatainak összehasonlításával írható le a sejtciklus-dependens transzkripció

program. Ilyen fázis-homológ sejtcsoportok nyerhetők (1) szinkronizálással, (2) mitotikus lerázással, (3) centrifugális ülepítéssel és (4) áramlási citométerrel történő szortolással.

A szinkronizálás a legszélesebb körben alkalmazott technika a sejtciklusdependens változások vizsgálatára, melyet mind a sejtciklusdependens transzkripció mind a sejtciklusdependens transláció [370] vizsgálatára is alkalmaznak, a metodikát számos kritika is érte. Az érzékenyebb sejttípusok esetén a kezelések óhatatlanul letálisak lehetnek [369], a normális, diploid emlőssejtek korán elvesztik szinkronizáltságukat [368,371] és csupán egy részük (50-70%) köteleződik el a további sejtosztódások irányába [372]. A sejtciklus gátlószerekkel (pl. timidin) történő kezelés a ciklinek időelőtti expresszióját okozva növekedési imbalanszt (growth imbalance) okoz [373,374], emellett a DNS szintézisének gátlásával aktiválja a G2/M ellenőrzőpontra keresztül az ATM/ATR jelátvitelt [375], így megzavarja a sejtciklus optimális működését [374,376].

A szinkronizálás mellett a letapadó sejtek mitózisa során az interfázisra jellemző morfológiával rendelkező sejt felkerekedik, adhéziója a tenyésztőedény aljzatához csökken. Ezt a csökkenő fizikai kötődést használja ki a mitotikus lerázás módszere [369,377]. Ennek során megelőző gyógyszeres szinkronizálást követően vagy attól függetlenül, a sejtenyészetet mechanikus rázóerőknek kitéve a kevésbé letapadó lekerekedett, M fázisú sejtek szelektálása történhet meg. A módszer korlátai közé tartozik, hogy csak az M fázisú sejtek szelektálása történhet meg, illetve, hogy csak letapadó sejteken alkalmazható. A centrifugális ülepítés során a sejtek nagysága alapján történik az elválasztás [378,379]. Az ülepítőkamrában uralkodó centrifugális sebesség és az ennek síkjára merőlegesen bocsátott pumpáló erőhatás finomhangolása teszi lehetővé a különböző méretű (és különböző fázisokba tartozó) sejtek szeparálását. Bár az ülepítőberendezés kialakítása bonyolultabb infrastruktúrát igényel, mint az előző metodikák során használt gyógyszeres kezelés, vagy a lerázás, ennek a technikának is előnye az, hogy csupán minimális perturbáció történik a sejtciklus mechanizmusában. A centrifugális ülepítés alkalmazásával sikeresen vizsgálták a sejtciklusdependens transzkripció szabályozását élesztőgombákban [380,381].

Az eukarióta, diploid sejtek sejtciklusa során a G1 fázisban található 2N mennyiségű DNS tartalom az S fázis folyamán duplázódik meg és a G2 fázisra 4N mennyiségű lesz. A DNS tartalomnak ezt a változását specifikus és sztöchiometrikus DNS-festés (pl. propídium-jodid) alapján áramlási citométerrel detektálni tudjuk. Az áramlási citométerek újabb generációi a detektálás mellett bizonyos – általunk kijelölt – fajlagos (egységnyi sejtre vonatkoztatott) küszöbintenzitások közé tartozó fluoreszcens intenzitású sejteket szét is tud válogatni. Ez adja az alapját a *fluoreszcencia aktiválta sejtválogatásnak* (fluorescence activated cell sorting – FACS). A propídium-jodid ugyanakkor membrán-impermeábilis festék, mely az apoptotikus sejtek

kimutatására széles körben használt, viszont viábilis sejtek örökítőanyagának festésére alkalmatlan [382]. A sejtciklusdependens transzkripció vizsgálatakor olyan DNS festék szükséges, mely a viábilis sejtek örökítőanyagát képes jelölni, minimálisra csökkentve a sejt normális működésének bármínemű befolyásolását [383]. Ehhez új festékek kerültek kifejlesztésre [384]. Hoechst 33342 festék használatával sikeresen szortoltak különböző fázisú sejteket humán húgyhólyag tranzicionális sejtes karcinóma sejtvonalból, melyeken a ciklin B1 különböző expresszióját is demonstrálták [385]. Vybrant DyeCycle Orange festék használatával sikeresen szortoltak különböző limfoblasztoid sejteket a sejtciklus különböző fázisaiba [386].

II.5.4. A sejtciklusdependens transzkripció program és szabályozása

A sejtciklusdependens transzkripció vizsgálata során egy konkrét mRNS vagy egyszerre sok transzkript vizsgálata lehetséges. Először Northern-blot alapú vizsgálatokkal egy-egy mRNS esetében igazolták a sejtciklusdependens expressziót [387], legkorábban a sarjadzó élesztő hiszton fehérjéinek sejtciklussal korreláló expresszióját írták le [387,388]. A nagy áteresztőképességű technikák elterjedésével (pl. microarray vizsgálatok), elérhetővé vált a teljes sejtciklusdependens transzkripció program vizsgálata. Ennek segítségével számos vizsgálat történt a sarjadzó élesztő sejtciklusdependens transzkripció programjának vizsgálatára, melyek külön-külön kb. 800-1000 sejtciklusdependens expressziót mutató mRNS-t írtak le [389–391]. Három vizsgálat összehasonlító elemzésével 440 olyan transzkriptot találtak, melyek mindhárom esetben sejtciklusdependens kifejeződést mutattak. További vizsgálatok a hasadó élesztő modellorganizmuson a transzkriptok kisebb hányadát találták sejtciklusdependens expressziót mutatónak (a három vizsgálatból csupán 171 transzkript volt átfedő) [392–394]. Humán sejtekben történt vizsgálatok 1000 körüli mRNS esetében vetették fel a sejtciklusdependens expressziót [366–368].

Eukarióta sejtekben, a sejtciklus egyes fázisaiban kulcsfontosságú regulátorok és effektorok kifejeződése egymást követően, hullámszerű transzkripció aktivitás eredményeképpen történik [395,396]. Az első hullám során a G1/S átmenetben fontos transzkriptok kifejeződése történik meg. Emlős sejtekben a G2/M átmenet transzkripció eseményeinek szabályozásáról kevesebbet tudunk, míg az M/G1 átmenet esetében a szabályozott transzkriptok detektálása is nehéz [397].

A humán sejtek transzkripció programjának jellemzését Cho és munkatársai kezdték [366]. Szinkronizált fibroblasztokban végzett kísérleteik során több mint 700 mRNS transzkript sejtciklusdependens expresszióját mutatták ki. A sejtciklus során észlelt dinamikus expressziós változások hasonlósága alapján sikerült definiálniuk gének olyan csoportjait (clustereit), melyek a késői G1, S, G2 és M fázisokban, fázis-specifikusan mutatnak emelkedett expressziót. Biológiai funkcióik alapján – többek között – a késői G1 fázis génjei a DNS replikációban, a G2 fázis génjei a

citoszkeletális reorganizációban, az M fázis génjei a kromoszómák szegregációjában érintettek [366].

Whitfield és munkatársai a tumorosan elfajzott HeLa méhnyakrák-sejtvonalon vizsgálták a sejtciklusdependens génexpressziót [367]. Több mint 850 sejtciklusdependens expressziót mutató gént írtak le és expressziós dinamikájuk alapján ezeket 5 csoportba osztották, melyek a G1/S, S, G2, G2/M, M/G1 fázisokban mutatták expressziós maximumukat. Megállapították, hogy a rosszindulatú daganatokban felülexpresszáldott gének nagy része megtalálható a sejtciklus transzkripció programjában, melyet azzal magyaráztak, hogy proliferatív daganatokban felülreprezentálódnak a sejtciklus későbbi fázisai (S, G2, M) és az azokra jellemző génexpressziós profil. Ugyanakkor, az M/G1 átmenetben tetőző expressziót mutató gének – melyek fontos szerepet töltenek be a sejt-sejt adhézióban és az aktin citoskeleton regulációjában – alulexpresszáldódnak az invazív, metasztatizáló, rossz prognózisú daganatokban [398–400].

Bar-Joseph munkacsoportja bioinformatikai módszerekkel tökéletesítve a szinkronizálást – *in silico* szinkronizálás – reanalizálta Whitfield HeLa sejtekből származó adatait és új méréseket végzett primér fibroblaszt tenyészetben [368]. 362 olyan mRNS transzkriptot definiált, mely ciklikus expressziót mutat mind a HeLa, mind a primér fibroblaszt sejtciklusa során (“közös” csoport), míg 119 gén csak HeLa és 118 gén csak primér, nem-transzformált fibroblasztokban mutat sejtciklusdependens expressziót. Emellett kimutatták, hogy rákosan elfajzott sejtekben szignifikánsan alacsonyabb a csak fibroblasztokban ciklikus expressziót mutató gének átlagos expressziója a “közös” csoportba tartozó gének átlagos expressziójához képest, míg ép, mitotikus aktivitást nem mutató vagy ép, aktívan osztódó sejtek esetében nem ábrázolódott szignifikáns különbség. Ez alapján a csak ép fibroblasztokban sejtciklusdependens expressziót mutató transzkriptoknak kiemelkedő jelentőségük lehet az ép sejtciklus szabályozásában, mely elvesződik a malignus transzformáció során [368].

Cho, Whitfield és Bar-Joseph munkacsoportjainak vizsgálatai szinkronizálást követő microarray mérések alapján történtek. Shedden és Cooper újraanalizálta Cho eredményeit és összehasonlították egy – az eredeti mérésekből – random generált adatsorral, melynek során azt találták, hogy a random adatsor elemei legalább olyan erős ciklicitást mutatnak, mint az eredeti mérés elemei [401]. Felvetették, hogy a szinkronizáláshoz használt eljárások – jelen esetben timidin – is képesek ciklikus génexpressziót indukálni, amelyek hiányoznak a nem-szinkronizált tenyészetekben. Korábban említettük, hogy további hatásait is leírták a különböző szinkronizálási módszereknek, melyek megváltoztatják a sejtciklus működését és így meghamisíthatják az ilyen kísérletekből kapott eredmények nem feltétlenül extrapolálhatóak az ép sejtciklusra. Ezen limitációk elkerülése végett *Shedden és Cooper* definiálta azokat a *kritériumokat*, melyeknek teljesülniük kell azon kísérletek esetében, melyek sejtciklusdependens génexpressziót hivatottak

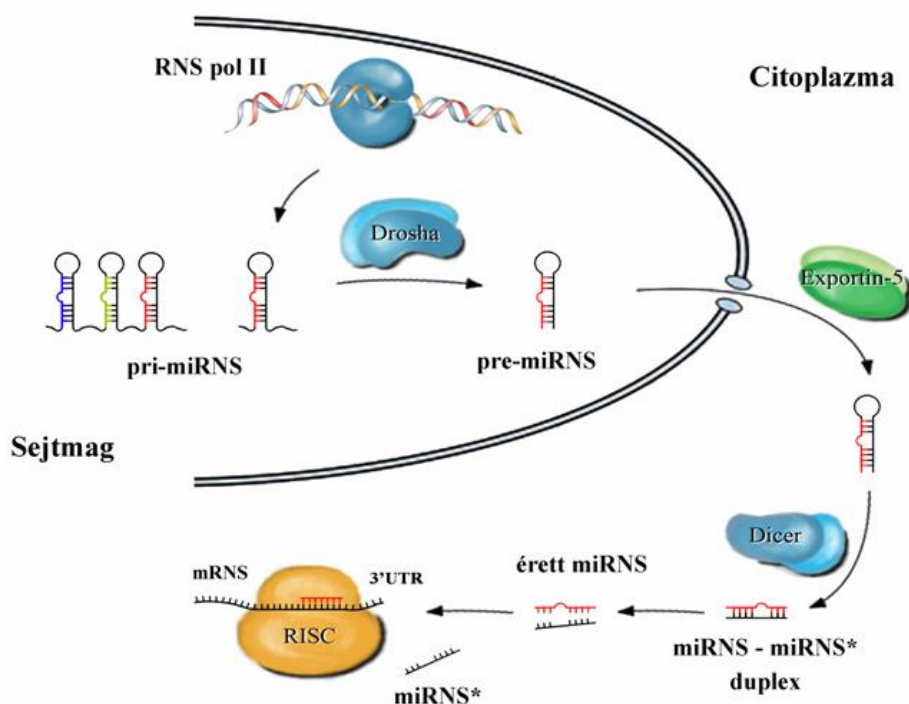
leírni. Ezek szerint, egy gén esetében sejtciklusdependens expresszióról beszélhetünk, amennyiben (i) a kísérletek során semmilyen inhibíció (klasszikus szinkronizálás) vagy éheztetés (szérum éhezés) módszer nem került alkalmazásra, (ii) az eredmények reprodukálhatóak, (iii) többféle expressziót mérő metodika is egybehangzó eredményre jutott (pl. microarray és qRT-PCR), továbbá (iv) nem-szinkronizált kísérletek és (v) optimális statisztikai analízisek is megerősítik az eredményeket [401]. Ezen sheddeni és cooperi kritériumoknak eleget tevő teljes expressziós vizsgálatok ugyanakkor még nem történtek.

II.6. MIKRO-RNS-EK

II.6.1. A mikro-RNS-ek jellemzői és biogenezeise

A mikro-RNS-ek 16–29 nukleotidból álló nem kódoló RNS-molekulák, amelyek az ún. RNS-interferencia révén szabályozzák a géntranszkripciót, irodalmi adatok alapján a humán génátíratok kb. 30–50%-ának szabályozásában vesznek részt [402,403]. Az első mikro-RNS-t két kutatócsoport egymástól függetlenül fedezte fel. Kimutatták, hogy a lin-14 génnel komplementer lin-4 gén által kódolt 22 nukleotidból álló RNS-molekula a lin-14 gén expresszióját gátolja poszttranszkripció szinten [404,405]. A mikro-RNS-ek valódi jelentőségét azonban csak azután ismerték fel, miután különféle fajokban számos hasonló, kisméretű RNS-t azonosítottak [406,407].

A mikro-RNS-eket kódoló gének gyakran más gének intronjaiban találhatók, és az adott gén (host gén) promóterének és szabályozó elemének felügyelete alatt állhatnak, míg más mikro-RNS gének a genom nem-kódoló részén policisztronos clusterekben, vagy egyszerűen önmagukban helyezkednek el [408]. A mikro-RNS génekről átíródó primer transzkriptum (pri-miR) az RNS-polimeráz-II közreműködésével képződik a sejtmagban. A pri-miR-t a sejtmagban endonukleáz (Drosha) hasítja prekursor miR-ré (pre-miR). Ezek a pre-miR-ek 60–100 nukleotidból állnak, és jellegzetes hajtúszerű szerkezettel rendelkeznek. A sejtmagból egy exportin-5 nevű fehérje (RanGTPáz) segítségével jutnak ki a citoplazmába, majd egy citoplazmatikus ribonukleáz (Dicer) közreműködésével a hajtúszerű pre-miR-ből kettős szálú RNS-molekula képződik (**13. ábra**). A duplex szálainak szétválását követően az egyik szálból keletkezett 16–29 nukleotid méretű érett mikro-RNS-fehérje komplexbe integrálódik, melyet RISC-nek neveznek (RNS induced silencing complex). Ez a komplex hozza létre a cél-mRNS lebomlását vagy a transláció gátlását; a mikro-RNS hozzákötődik az mRNS 3' nem átíródó végéhez (3'UTR, untranslated region). Növényekben ez a mikro-RNS–mRNS kötődés csaknem teljes komplementaritás alapján jön létre és az mRNS lebomlását eredményezi. Állati és humán sejtekben ez a kötődés nem tökéletes, de a transláció gátlását, valamint az mRNS degradációját okozhatják [409].



13. ábra. A mikro-RNS-ek biogenezise

A mikro-RNS-ek biológiai jelentősége sokrétű, szerepük van a sejtproliferáció, a sejt differenciálódás, az egyedfejlődés, a celluláris jelátvitel, a sejthalál szabályozásában, és jelentőségük lehet különböző betegségek, köztük a daganatok patomechanizmusában [410–414]. Humán daganatokban lehetséges jelentőségükről 2002 óta közölnek adatokat. Számos daganattípusban, köztük krónikus lymphoid leukaemiában, tüdő tumorban, köpenysejtes lymphomában, colorectalis carcinomában, emlő- és pajzsmirigy-carcinomában, glioblastomákban és hypophysis daganatokban találtak megváltozott mikro-RNS expressziós profilt [405,415–422]. Több tanulmányban kimutatták, hogy az adott daganatban jelentőséggel bíró gén expressziója negatívan korrelál a specifikus mikro-RNS expressziójával, aminek alapján a mikro-RNS-eket funkciójuk szerint onkogénnek vagy tumorsuppresszornak minősítjük. A mikro-RNS-expressziós mintázat egyes daganatokban tükrözi a típus és stádium eltéréseit [416,423].

II.6.2. A mikro-RNS -ek szerepe hipofízis adenomákban

A mikro-RNS-ekkel kapcsolatos kutatásunk kezdetén az NCBI Pubmed adatbázisa „microRNA AND pituitary” keresőszavakra mindössze 16 találatot adott. Ezek között 5 foglalkozott ténylegesen a hipofízis mikro-RNS eltéréseivel: négy az adenomák patogenezisével kapcsolatban, egy pedig a GnRH hatásra bekövetkező mikro-RNS-expressziós profil változását vizsgálta. Bottoni és mtsai által készített mikro-RNS microarray 30 eltérően expresszáldó mikro-

RNS -t azonosított a normális és adenomás szövetekben. A szerzők valószínűsítették, hogy a hipofízis adenomákban fokozottan expresszálnak talált miR-150, miR-152, miR-191 és miR-192 befolyásolhatják a sejtproliferációt a korábban közölt vizsgálatok alapján [424]. Az adenomák méretével összefüggően 6, míg bromocriptin kezelés hatására szintén 6 mikro-RNS eltérő expresszióját mutatták ki. Az adenomákban csökkent expressziójú miR-16-1 kísérletesen megerősített célpontja, a BCL2 a daganatok egyharmadában fokozottan expresszáldott, így lehetséges, hogy a miR által szabályozva részt vesz ezeknek a daganatoknak a kialakulásában [415].

ACTH termelő adenomákban 8 csökkent működésű mikro-RNS-t azonosítottak, melyek klinikummal összefüggését nem sikerült bizonyítani [425].

A mikro-RNS-ekhez kapcsoló kutatás során nem elegendő beazonosítani a mikro-RNS-eket, hanem a biológiai hatásuk megértéséhez szükséges a feltételezett célgénjeikkel történő interakciót is bizonyítani. Hipofízis vonatkozásában riportergén-kísérlettel igazolták a let-7-HMGA2 közötti interakciót, amelyek expressziója közötti negatív korreláció a hipofízisben patogenetikai szerepükre utalhat [300].

II.6.3. Mikro-RNS-ek szerepe a sejtciklus szabályozásában

Daganatképződés során a protoonkogéneket targetáló miRNS-ek (TS-miR – tumor szuppresszor mikro-RNS) csökkent és a tumor szuppresszor géneket targetáló mikro -RNS-ek (onko-miR – onkogén mikro-RNS-ek) emelkedett expresszióját írták le [426,427]. Elsőként a hsa-miR-16 család tagjait – mint TS-miR-ek – kódoló genomikus lókuszt delécióját írták le krónikus limfoid leukémiában [416]. Később igazolódott, hogy a mikro-RNS-eket kódoló gének több mint fele olyan kromoszómális lokalizációkon kódolódik, melyek a daganatképződés során gyakran deletálódnak vagy válnak transzkripcionálisan elcsendesítetté [417]. A **14. táblázat**ban néhány példát hozunk olyan mikro-RNS – cél mRNS interakciókra, melyeknél a TS-mikro-RNS-ek csökkent kifejeződése együtt járt a targetált protoonkogén sejtciklus regulátor (ciklinek, CDK-k) felülexpresszáldásával, vagy az onkomir emelkedett kifejeződése következtében a targetált tumor szuppresszor sejtciklus regulátor (CDKi) csökkent módon fejeződött ki [428].

A sejtciklus regulátorainak és a mikro-RNS-eknek a kölcsönhatása nem egyirányú. Bueno és munkatársai szérumból sokkot alkalmazva kimutatták, hogy a sejtciklusdependens expressziót mutató E2F1 és E2F3 transzkripciós faktorok fokozzák az ismerten TS-miR funkciójú hsa-miR-16 és hsa-let-7 család tagjainak expresszióját és – a replikációs stressz kivédésén keresztül – segítik az E2F-mediálta sejtciklus progresszió finomhangolását [429]. Ofir és munkatársai ezzel egybehangzóan igazolták, hogy az E2F1-mediálta miR-15 expresszió-fokozódás ciklin E-re való csendesítő hatása negatív előrecsatolás útján járul hozzá a G1/S átmenet finomhangolásához [430].

14. táblázat – Mikro-RNS-ek szerepe a sejtciklus regulátorainak szabályozásában daganatképződés során – Piros háttér a dagantokban észlelt emelkedett, zöld háttér a daganatokban észlelt csökkent expressziót jelzi ép szövetekhez képest. Az egyes mikro-RNS-mRNS fizikai interakciói a hivatkozott cikkekben kerültek bizonyításra [321].

Sejtciklus regulátor		miRNS	Daganat
csoport	regulátor		
ciklin	D1 ciklin	hsa-miR-15b	glioma
		hsa-miR-16	prosztatarák
		hsa-let-7b	melanóma malignum
	D2 ciklin	hsa-miR-29c	gyomorrák
	D3 ciklin	hsa-let-7b	melanóma malignum
	E1 ciklin	hsa-miR-132	oszteoszarkóma
		hsa-miR-7	hepatocelluláris karcinóma
		hsa-miR-15a	emlőrák
	A ciklin	hsa-let-7b	melanóma malignum
	B1 ciklin	hsa-miR-410	gonadotróp hipofízis adenóma
hsa-miR-379		emlőrák	
CDK	CDK4	hsa-let-7b	melanóma malignum
		hsa-miR-124	emlőrák
		hsa-miR-195	húgyhólyagrák
		hsa-miR-506	petefészek daganat
	CDK2	hsa-miR-200c	világossejtes veserák
		hsa-miR-638	akut mieloid leukemia
		hsa-miR-885-5p	neuroblasztóma
		hsa-miR-372	méhnyakrák
	CDK1	hsa-miR-7	mellékvesekéreg-karcinóma
		hsa-miR-582-5p	hepatocelluláris karcinóma
hsa-miR-490-3p		petefészek daganat	
CDKi	p21	hsa-miR-106b	gyomorrák
	p27		melanóma malignum
		hsa-miR-221	gyomorrák
		hsa-miR-429	prosztatarák
		hsa-miR-25	oszteoszarkóma
		hsa-miR-452	hepatocelluláris karcinóma
	hsa-miR-200b	vastagbél tumor	

A sejtciklusdependens mikro-RNS transzkripció program vizsgálatára további kísérletek is történtek. Bueno munkacsoportja elrett Rissland és munkatársai kimutatta a hsa-miR-16 család expressziójának dinamikus változását szérum hatására [431]. HeLa sejteken timidin szinkronizálást követően történt mikro-RNS mérés során 25 sejtciklus dependens expressziót mutató mikro-RNS-t igazoltak [432].

Mindezen előzetes eredmények alapján kutatómunkánkban a sejtciklus-dependens, dinamikus mikro-RNS expresszió vizsgálatát tűztük ki célul, abból az okból, hogy esetleg beazonosíthassunk olyan mikro-RNS-eket, amelyek módosításával a sejtciklus is módosíthatóvá válik.

III. CÉLKITŰZÉSEK

I. Örökletes endokrin tumorszindrómákért felelős genetikai eltérések beazonosítása a hazai beteganyagban:

1. A *RET* protoonkogén mutációk geno-fenotípus összefüggései MEN2 szindrómában
2. A *VHL* gén eltérések vizsgálatával beazonosítani a hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegeket
3. A *VHL* gén Ser80Ile és a Pro25Leu variánsok patogenetikai szerepének tisztázása
4. A phaeochromocytomára és paragangliómára hajlamosító géneltérések közül a szukcinát dehidrogenáz enzim (SDH) alegységeit kódoló gének (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*; *SDHx* gének) és a *TMEM127* mutációnak hazai feltérképezése
5. Az *SDHx* gének aminosavcserével járó génvariánsok fenotípust módosító szerepének tisztázása MEN2-s betegekben
6. Bemutatni az együttesen előforduló *SDHC* és *PTEN* mutációkkal társult klinikai fenotípust
7. Feltérképezni a csírasejtes *SDHx* variánsok hatását Cowden és Cowden-szerű szindrómában szenvedő betegekben
8. A szukcinát hatásainak összegzése a tumorigenézisben, új jelátviteli mechanizmusok megismerése céljából
9. A MEN1 szindrómáért felelős *menin* mutációk beazonosítása és a társult fenotípus tisztázása hazai betegekben
10. MEN1 szindrómában előforduló mellékvesedaganatok és a *menin* és interakciós partnereinek szerepe a mellékvesekéreg daganatok patogenézisében, a *menin* dinamikus interakciónak bemutatása a tumorigenézisben
11. Nemzetközi együttműködés keretén belül új genotípus-fenotípus összefüggések feltárása MEN2 és örökletes Phaeo/PGL-ákban

II. A helyi (szöveti) hormonhatásban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének: a 21-hidroxilázt kódoló gén (*CYP21A2*) és a glükokortikoid receptort kódoló gén (*GR*) gyakori variánsait célzó vizsgálatokkal az alábbi specifikus kérdéseket vizsgáltam:

12. A *GR* N363S variánsának szerepe jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenézisében
13. A *GR* gén BclI polimorfizmus kimutatására kidolgozni egy olcsó és gyors PCR alapú módszert

14. A *C4B* gén kópiaszámának hatása az ACTH stimulációt követő kortizol válaszra jóindulató mellékvesekéreg adenómás betegekben
15. A *CYP21A2* gén gyakori génvariánsok összefüggnek-e a keringésben mérhető mellékvesekéreg hormon koncentrációkkal

III. A hormonrendszer daganataiban zajló molekuláris mechanizmusok vizsgálatában a következő célkitűzéseket fogalmaztam meg:

16. Hogyan lehet integrálni a különböző szintekről (RNS, DNS és fehérje) származó nagy áteresztőképességű módszerrel kapott mérési eredményeket és hogyan lehet ezeket funkcionálisan validálni?
17. A *GR-t* kódoló gén izoformái expresszálódnak-e a mellékvesekéregben és a hormont termelő daganatokban?
18. A mellékvesekéregben működik-e perifériás óra és a GR izoformáknak van-e szerepe ennek a szabályozásában?
19. Mi a szerepe a GR β izoformának a géntranszkripcióban?
20. Különbözik-e a mikroRNS expressziós mintázat hipofízis daganatokban, és milyen jelátviteli utak érintettek általuk?
21. A daganatokban fokozott expressziót mutató mikro-RNS-ek szabályozzák-e a sejtciklus G2/M átmenetben szerepet játszó WEE1 kinázt?
22. Vannak-e egyéb gén-mikroRNS interakciók, amelyek a G2/M átmenetet szabályozzák, hipofízis adenómákban?
23. Milyen mikro-RNS-ek vesznek részt a TGF β jelátviteli út szabályozásában?
24. Hogyan lehet gyógyszermentesen vizsgálni a sejtciklus-dependens ingadozást mutató gén és mikro-RNS expressziót? Milyen a mikro-RNS expresszió a sejtciklus fázisaiban?
25. Van-e olyan fehérje, amelyek sejtciklus dependens módon expresszálódnak és a mellékvesekéregrákban prognosztikai vagy terápiás marker lehet?
26. A keringésben kimutatható mikro-RNS-ek lehetnek-e biomarkerek a hormonrendszer betegségeiben?
27. A mellékvesekéregrákban a keringésből mérhető mikro-RNS-ek koncentrációját befolyásolják-e a betegek kivizsgálása során használt dinamikus endokrin tesztek?
28. Milyen a *menin* expresszió *MEN1*-hez társult és sporadikus mellékpajzsmirigy adenómákban? Milyen szerepe van szindrómás és sporadikus mellékpajzsmirigy adenómákban a *MEN1* 3' UTR-t célzó mikro-RNS-eknek?

IV. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Betegek

IV.1.1. Örökletes endokrin tumorszindrómákban szenvedő betegek

Az örökletes endokrin tumorszindrómákban szenvedő betegek genetikai kivizsgálása a **Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Genetika Laboratóriumában** történik. PhD munkám során került a laboratórium kialakításra, ami azóta is folyamatosan működik. A betegek genetikai tanácsadást követően Beleegyező Nyilatkozatot írnak alá, majd perifériás vérmintavételezés történik. Valamennyi humán mintán végzett vizsgálathoz érvényes engedéllyel rendelkezünk az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságától és minden résztvevő beteg és hozzátartozó esetében a genetikai vizsgálat végzéséhez beleegyező nyilatkozat aláírása után került sor mintavételezésre. Az örökletes tumorszindrómákban szenvedő betegek legfontosabb klinikai, laboratóriumi, patológiai és genetikai jellegzetességeit az adott kórkép eredményei között mutatom be.

A *Multiplex Endokrin Neoplázia 2-es* típussal diagnosztizált betegek közül az első vizsgálatban 18 családból 40 örökletes medulláris pajzsmirigyrákos (MTC) beteg elemzésére került sor. A második vizsgálatban, amelynek során az *SDHx* génpolimorfizmusok fenotípus módosító hatását elemeztük összesen 77 csírasejtes *RET* mutációt hordozó MEN2 szindrómában (55 MEN2A), 48 sporadikus MTC, 48 sporadikus Phaeochromocytómás (Phaeo) beteg vizsgálatára került sor. A sporadikus MTC és sporadikus Phaeo/PGL betegek esetében a *RET* és a Phaeo/PGL génnek közül patogén eltérést az *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* és *MAX* gének vizsgálata negatív eredményt mutatott.

A hazai *VHL* betegségben szenvedők feltérképezése során összesen hét család 35 tagja valamint a Ser80Ile mutáció elemzése során 1 család 32 tagjának vizsgálatára került sor. Az *SDHx*, *TMEM127*, *MAX* gének vizsgálata további 82 látszólag sporadikus Phaeo/PGL-s betegekben történt meg.

Az Amerika-i Egyesült Államokban végzett kutatómunkám során összesen 375 *PTEN* mutáció negatív Cowden szindróma (CS) vagy Cowden-szindrómára emlékeztető (CS-szerű) beteg genetikai vizsgálatában vettem részt. Itt ismertük fel a mindezidáig egyetlen olyan betegek, aki *PTEN* és *SDHC* mutációt is hordozott. Az USA-ban hatályos betegellátási protokollnak megfelelően a betegek genetikai tanácsadáson vettek részt, amit követően került sor a mintavételezésre. A genetikai tanácsadást abban jártas humán genetikus vagy onkogeentikus szakorvos végezte.

A SE II. Belgyógyászati Klinikán *MEN1* szindróma miatt kezelt és vizsgált 19 család 32 betegében végeztük el a *MEN1* gén vizsgálatát. A betegek klinikai adatait az eredmények bemutatása során ismertetem.

A mellékvesedaganatok diagnosztikájában szóbaeső keringő mikro-RNS-ek szintjére a HPA tengely működésének vizsgálatára alkalmazott hormontesztek (Dexametazon szupresszió és ACTH stimuláció) hatását vizsgáló tanulmányunkban feldolgozott betegek a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika endokrin beteganyagából választottunk betegeket, akikben ezeknek a teszteknek az elvégzése indokolt volt a diagnózis felállításában. A betegek demográfiai és hormonméréseinek eredményeit az **15. táblázat** tartalmazza.

15. Táblázat: a mellékvesekéreg hormonok dinamikus vizsgálatában használt betegek mintái a keringésben mérhető mikro-RNS-ek detekciójához.

Beteg száma	Nem F/N	Életkor (év)	Betegség/ a vizsgálat indikációja	Kiindulási plazma kortizol (µg/dl)	kortizol (µg/dl) 1 mg Dex adását követően
1	N	73	obezitás	12.6	1.6
2	N	30	obezitás, hirsutizmus	19.5	0.5
3	F	65	obezitás	10.7	0.9
4	F	45	hipertónia	17.4	0.9
5	N	61	obezitás, hipertónia	9.4	1.6
6	N	68	mellékvesekéreg incidentalóma	13.5	1.8
7	F	65	mellékvesekéreg incidentalóma	25.6	1.7
8	F	68	mellékvesekéreg incidentalóma	19.4	1.7
9	F	59	mellékvesekéreg incidentalóma	17.6	1.8
10	N	20	obezitás	20.0	1.3

Beteg száma	Nem F/N	Életkor (év)	Betegség/a vizsgálat indikációja	Kiindulási plazma kortizol (µg/dl)	Kortizol 250 µg tetracosactid után (µg/dl)
1	N	30	sec. amenorrhoea	14.4	35.8
2	N	46	mellékvesekéreg elég telenség gyanúja	6.6	20.7
3	N	36	gyengeség	13.4	31.4
4	N	23	raromenorrhoea	16.3	33.9
5	N	36	infertilitás	7.2	29.5
6	N	37	sec. amenorrhoea	14.2	35.4
7	N	34	raromenorrhoea	26.0	35.7

8	N	23	hirsutizmus	16.0	32.3
9	F	60	mellékvesekéreg elégtelenség gyanúja	15.4	28.0
10	N	23	infertilitás	11.0	34.4

IV.1.2. Sporadikus, jóindulatú mellékvesekéreg adenómával diagnosztizált betegek

A SE II. Belgyógyászati Klinikán gondozott jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegek közül munkám során 99 egyoldali, 44 kétoldali mellékvese adenómás, 100 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő beteget és 102 populációs kontroll egyént elemeztünk a *GR génvariánsok* vizsgálatához. Az összes betegnél részletes klinikai és hormonális kivizsgálás történt, amely valódi és szubklinikai Cushing szindrómát, phaeochromocytomát, primér aldosteronizmust és hiperandrogenizmust kizárt. Az egyoldali mellékvese daganatos betegek közül 32 betegben történt féloldali adrenalectomia a tumor 4 cm-nél nagyobb mérete, vagy a követés során észlelt daganat-övekedése miatt. 27 betegben állt rendelkezésre a szövettani diagnózis eredménye, amely 23 betegben mellékvesekéreg adenómát, 2 betegben mikroadenomatózus hiperpláziát, egy betegben atípusos kéregadenómát, egy betegben pedig mellékvese kéreg adenómát mutatott csont metaplasiával. A 102 kontroll személyben és a 100 2-típusú diabetes mellitusban szenvedő betegben a HPA tengely működés zavarának semmilyen klinikai jelét nem észleltük.

A mellékvesekéreg adenómás betegek közül 77 esetben voltak meg az alap és ACTH-stimulált kortizol értékek így a *C4B* gén kópiaszámának valamint a *CYP21A2* gén gyakori variánsainak hatását ezekben a betegekben tudtuk vizsgálni.

IV.1.3. Hormonvizsgálatok

Vizsgálataink során valamennyi mellékvesedaganattal vagy hipofízis daganattal diagnosztizált és kezelt beteg részletes hormonális kivizsgáláson esett át. A szérumszteroid hormonok mérésében a 2002-es NIH konszenzus ajánlás volt. Mértük a reggeli (8 és 9 óra között), éjszakai illetve alacsony dózisú dexamethason szuppressziós tesztet követő szérumszteroid szinteket, az ACTH alap és metyrapon kezelést követően, a kortikoszteron, dezoxikortikoszteron és dehidroepiandrosteron-szulfát koncentrációkat, valamint a 17-hidroxiprogesteron koncentrációkat alap és ACTH-stimuláció után. A kortikoszteroid koncentrációkat a Semmelweis Egyetem ÁOK II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Laboratóriumában kifejlesztett nagy specificitású radioimmunoassay módszerekkel határoztuk meg [433,434] vagy elektrokemilumineszcens immunoassay-vel végeztük (Elecsys, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) a gyártó előírásainak megfelelően. Vizelet és plazma metanephrin szint meghatározása mellett a hypertoniás betegeknél szérumszódium, kálium és aldosteron/renin mérés is történt.

IV.2. Daganatszövetek

IV.2.1. Hipofízis daganatok

Összesen 110 (80 NFA, 15 GH-termelő adenoma PRL termeléssel vagy a nélkül /GH±PA/ és 15 ép szövet /NH/) hipofízis szövetminta került feldolgozásra. Az adenoma szöveteket transspheoideal is műtéttel távolították el az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben. A betegek a vizsgálatról teljes körű információt kaptak és ezt követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A daganatok osztályozása a betegek klinikai paraméterei, hormonleletei és az eltávolított adenomák patológiai vizsgálata alapján történt (16. táblázat). A rutin szövettani vizsgálat, a hipofízis mellső lebeny hormonok immunhisztokémiai vizsgálata és a MIB1 proliferációs marker meghatározása a Semmelweis Egyetem I. sz Patológiai és Rákkutató Intézetében történt.

16. táblázat. A vizsgált betegek klinikopatológiai adatai

Kor	Nem	Mikro- / makro-adenoma	Klinikai diagnózis	Immunhisztokémia (előlebe ny hormonok és SF1), RT-PCR	Tumor méret (operáció előtt) mm ³	MIB1 (%)	Szérum PRL (ng/ml)	Szérum GH (ng/ml)	Szérum IGF1 (ng/ml)
46	N	Makro	NFA	Null sejtes	31350	0	9,09	0,3	-
65	N	Mikro	NFA	Gonadotróp	127,4	2,5	1,1	-	-
70	N	Makro	NFA	Gonadotróp	15000	0	-	-	-
71	N	Makro	NFA	Null sejtes	12000	0	15	-	-
55	F	Makro	NFA	Gonadotróp	4821	0,6	5	-	-
66	F	Makro	NFA	Gonadotróp	15000	1,5	9,11	0,39	-
36	F	Makro	NFA	Gonadotróp	1750	0	12,8	0,1	86,9
29	N	Makro	NFA	Gonadotróp	6000	0	93,2	-	-
55	N	Makro	NFA	Gonadotróp	11592	2	56,1	0,33	-
58	F	Makro	NFA	Gonadotróp	5130	0	11,6	-	-
75	N	Makro	NFA	Gonadotróp	8400	0	46,3	-	-
34	F	Makro	NFA	Gonadotróp	26250	0	11,8	-	-
69	F	Makro	NFA	Gonadotróp	11700	NA	12,9	-	-
74	F	Makro	NFA	Gonadotróp	26400	3	-	-	-
55	N	-	NFA	Gonadotróp	-	2	-	-	-
73	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
40	N	Makro	NFA	Null sejtes	19344	2	-	-	-
31	N	-	NFA	Null sejtes	-	4	8,89	-	-
80	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-
43	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0	1,2	-	-
50	F	-	NFA	Gonadotróp	-	2	6,42	-	-
61	F	Makro	NFA	Gonadotróp	12690	3	22,04	-	-
53	F	-	NFA	Gonadotróp	-	3	26,37	-	-
68	N	-	NFA	Gonadotróp	-	2	8,68	-	-
72	F	Makro	NFA	Gonadotróp	4420	1	-	-	-
55	F	Makro	NFA	Gonadotróp	21952	<2	-	-	48,8
48	N	-	NFA	Gonadotróp	-	<2	-	-	-

77	F	Makro	NFA	Gonadotróp	7200	NA	12,1	-	-
60	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-
37	N	Makro	NFA	Gonadotróp	13800	5	-	-	-
38	N	-	NFA	Gonadotróp	-	7,5*	12,75	-	-
27	N	Makro	NFA	Gonadotróp	1848	5	-	-	-
64	F	Makro	NFA	Gonadotróp	40460	1	07.júl	-	-
73	F	Makro	NFA	Null sejtes	1320	4*	10,85	-	-
49	F	-	NFA	Gonadotróp	-	6*	-	-	-
53	F	-	NFA	Gonadotróp	-	0,5	-	-	-
61	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1,2	-	-	-
67	F	-	NFA	Gonadotróp	-	2,5	-	-	-
80	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
41	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0	-	-	-
64	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-
58	N	Makro	NFA	Gonadotróp	1989	2,5	9,62	-	-
53	F	-	NFA	Gonadotróp	-	5	-	-	-
65	N	Makro	NFA	Gonadotróp	3045	0	4,72	-	-
69	F	-	NFA	Gonadotróp	-	3	32,65	-	-
60	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
67	N	Makro	NFA	Gonadotróp	18240	3	-	-	-
45	F	Makro	NFA	Gonadotróp	36288	3	-	-	-
47	F	Makro	NFA	Gonadotróp	20020	2,5	-	-	-
36	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-
70	F	Makro	NFA	Gonadotróp	15625	1	17,39	-	-
60	F	Makro	NFA	Gonadotróp	8000	4	34,75	-	-
72	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0,5	-	-	-
36	N	Makro	NFA	Gonadotróp	11250	1	57,63	-	-
41	F	Makro	NFA	Gonadotróp	3840	2,5	5,73	-	-
75	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0	2,59	-	-
69	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1	9,08	-	-
79	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-
59	N	-	NFA	Gonadotróp	-	4	-	-	-
61	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-
53	N	-	NFA	Gonadotróp	-	2	-	-	-
75	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0,5	-	-	-
80	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0,5	24,38	-	-
79	F	Makro	NFA	Gonadotróp	30360	0,5	-	-	-
65	F	-	NFA	Gonadotróp	-	3	-	-	-
62	F	Makro	NFA	Gonadotróp	23750	1	-	-	-
36	F	-	NFA	Gonadotróp	-	2	-	-	-
48	F	-	NFA	Null sejtes	-	8*	3,61	-	-
70	F	Makro	NFA	Gonadotróp	5625	1	-	-	-
64	F	-	NFA	Gonadotróp	-	0,5	-	-	-
45	N	-	NFA	Gonadotróp	-	0,5	8,25	-	-
64	F	Makro	NFA	Gonadotróp	12500	1,5	16,63	-	-
53	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1	-	-	-

66	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
73	F	-	NFA	Gonadotróp	-	2,5	-	-	-
54	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
72	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
46	F	-	NFA	Gonadotróp	-	1,5	-	-	-
42	N	-	NFA	Gonadotróp	-	1	11,93	-	-
56	F	-	NFA	Gonadotróp	-	2	-	-	-
59	N	Makro	GHA	GH pozitív, PRL negatív	11616	2	-	16,6	981,3
56	N	Makro	GHA	GH negatív, PRL negatív	4800	0	-	13	717
56	F	Makro	GHA	GH pozitív, PRL negatív	1960	3	5,9	27,4	1295
37	F	Makro	GHA	GH pozitív, PRL pozitív	2160	-	10,5	8,5	-
52	N	Makro	GHA	GH pozitív, PRL pozitív	960	4	2,4	4,7	504,5
55	F	Mikro	GHA	GH pozitív, PRL pozitív	90	0	-	0,7	267
53	N	Makro	GHA	GH negatív, PRL negatív	5355	0	6,7	9,9	815,9
20	F	Makro	GHA	GH pozitív, PRL pozitív	14000	4,5	25	>30	-
53	F	Makro	GHA	GH pozitív, PRL negatív	900	<1	4,7	29,4	850
48	N	Makro	GHA	GH pozitív, PRL negatív	750	0,03	5,9	27,3	905
69	N	Makro	GHA	GH pozitív, PRL negatív	-	0	4,7	5,8	488
27	N	Makro	GHA	GH pozitív, PRL negatív	-	0,05	2,7	7,3	908
43	F	-	GHA	GH pozitív, PRL negatív	-	-	-	-	-
42	F	-	GHA	GH pozitív, PRL negatív	-	-	5,9	-	527
42	F	-	GHA	GH pozitív, PRL negatív	-	0,02	5,2	2,3	-

Rövidítések: F: férfi; N: nő; Makro: makroadenoma, tumor méret > 1000 mm³; Mikro: mikroadenoma, tumor méret < 1000 mm³; +: pozitív; -: nem elérhető/nem készült; MIB1: proliferációs marker

IV.2.2. Mellékvesekéreggrák szövetminták

A ribonukleotid reduktáz 2-s alegységének (RRM2) a mellékvesekéreg karcinómák proliferációs aktivitásának függvényében való kifejeződését 12 humán mellékvesekéreg-karcinóma szövetmintán vizsgáltuk. A vizsgálatra kiválasztott, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében őrzött, formalinban fixált, paraffinba ágyazott daganatok korábbi, rutin szövettani diagnózisa megerősítette a mellékvesekéreg-karcinóma diagnózisát.

IV.2.3. Mellékpajzsmirigy daganatok

A menin expressziót és a *MEN1* 3' UTR-t célzó mikro-RNS-ek kifejeződését összesen 56 mellékpajzsmirigy szövetben határoztuk meg. Az 56 szövetminta közül 40 sporadikus mellékpajzsmirigy adenóma és 16 *MEN1* szindrómában szenvedő betegből eltávolított daganatszövet volt. A műtétek a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinkáján történtek. A szövetek hisztopathológiai feldolgozását a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetében

végezték. A szövetekből immunhisztokémiai vizsgálatokat, szomatikus *MEN1* gén mutáció analízist és a *MEN1* 3'UTR célzó mikro-RNS-ek expressziójának mérésére került sor. A módszerek részletezésére a dolgozat megfelelő részeiben kerül sor.

IV.3. Molekuláris genetikai módszerek

IV.3.1. Örökletes genetikai eltérések vizsgálatához alkalmazott módszerek

Az örökletes tumorszindrómákban valamint a genetikai asszociációs vizsgálatokhoz genomiális DNS-t izoláltunk kereskedelmi forgalomban kapható kittekkel (Roche DNA Isolation for Mammalian Blood, és Qiagen DNA Isolation kit). A mutációk analízise specifikus primerekkel végzett PCR során amplifikált DNS-szakaszok direkt szekvenálásával történt [59].

17. Táblázat: A *RET* protoonkogén mutációanalízisében használt primerek szekvenciája

Exon	Primer	Szekvencia 5'-3'
10-es exon	RET10F	5'-GCAGCATTGTTGGGGGACA-3'
	RET10R	5'-GTCCCGGCCACCCACT-3'
11-es exon	RET11F	5'-CATGAGGCAGAGCATAACGCA-3'
	RET11R	5'-GACAGCAGCACCGAGACGAT-3'
13-as exon	RET13F	5'-AACTTGGGCAAGGCGATGC-3'
	RET13R	5'-AGAACAGGGCTGTATGGAGC-3'
14-es exon	RET14F	5'-AAGACCCAAGCTGCCTGAC-3'
	RET14R	5'-GCTGGGTGCAGAGCCATAT-3'
15-ös exon	RET15F	5'-GTGACCGCTGCTGCTGCCATGG-3'
	RET15R	5'-CACCTGGCTCCTCTTCACGTAG-3'
16-os exon	RET16F	5'-AGGGATAGGGCCTGGCCTTC-3'
	RET16R	5'-TAACCTCCACCCCAAGAGAG-3'

18. táblázat: A *VHL* gén vizsgálatában alkalmazott primerek szekvenciái

Klasszikus PCR, direkt szekvenálás	Primerek (5'-3')
vhl exon 1	F: CACGACGTTGTAACACGAC- CGAAGACTACGGAGGTCGAC R: GGCTTCAGACCGTGCTATCG
vhl exon 2	F: CACGACGTTGTAACACGAC- ATTACAGGTGTGGGCCACCG R: GCCTGACATCAGGCCAAAAATTGAG
vhl exon 3	F: CACGACGTTGTAACACGAC-CCTTGAC- TGAGACCCCTAG R: GCTGAGATGAAACAGTGT
Real-time PCR	
vhl exon 1	F: CGC GAA GAC TAC GGA GGT R: CTT CAG ACC GTG CTA TCG TC
vhl exon 2	F: AAC CTT TGC TTG TCC CGA TA R: CAG GCA AAA ATT GAG AAC TGG
vhl exon 3	F: GAG ACC CTA GTC TGC CAC TGA R: CCA TCA AAA GCT GAG ATG AAA
GAPDH exon 8	F: GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT R: TCG CTG TTG AAG TCA GAG GA

Az ún. nagy deléciók kimutatására multiplex ligációs próba amplifikációt (MLPA) és qRT-PCR alapú metodikákat is beállítottunk. Az MLPA módszer alapelve az, hogy a célgén DNS-éhez komplementer DNS-próba fog kapcsolódni. A hibridizáláshoz a probát kettéhasított állapotban adjuk a denaturált, szolubilis DNS-hez, majd ligáz segítségével az illeszkedő végeket összekapcsolják. A ligáz csak kettős szálú DNS esetén, a próba és a denaturált DNS pontos összekapcsolódásakor működik. Munkám során a *VHL*, *SDHx* gének hemizigóta eltéréseinek kimutatásában alkalmaztam ezt a módszer.

A látszólag sporadikus előfordulású Phaeo/PGL betegek genetikai vizsgálata során az összes ismert gén mutáció analízisét bevezettük a klinikai genetikai laboratóriumi gyakorlatba (**19. táblázat**).

19. Táblázat: Az *SDHx*, *MAX* és *TMEM127* gének vizsgálatában használt primerek.

Exon	Forward primer	Reverz primer
SDHB-1	GCGGCTACTGCGCTATTG	GCTTTCCTGACTTTTCCC
SDHB-2	TCTGTTGTGCCAGCAAAATG	GCCTTCCAAGGATGTGAAAA
SDHB-3	ACATCCAGGTGTCTCCGATT	CTATCAGCTTTGGCCAGC
SDHB-4	GTCAGTGCTTGTCCTGAT	TGCAAATAAAAACAAAACCA
SDHB-5	GCTGAGGTGATGATGGAATCT	CCACACTCCTGGCAATCATC
SDHB-6	ATGCACTGACCCCAAAGGTA	CAGCAATCTATTGTCTCTTG
SDHB-7	CTTTCCTCTGCACTCCCAGA	TTGTGAGCACATGCTACTTC
SDHB-8	GGAAGGAGTTTCACCCAAGA	TGCTGTATTCATGAAAACCAA
SDHC-1	GTCACATGACACCCCAAC	CCCAGGCACAGGATAAACCG
SDHC-2	TCCCTTCACCCCTAAAAATAGA	ACTCCAGCCTGGGTGACA
SDHC-3	CATGCCTGGCTTGGTATTG	CCTTCAGAACTTTCACCCACT
SDHC-4	GAGCTGAGATCATGCCATTG	GCCAATGAAACAGCCAAGTT
SDHC-5	CAGGGGTCCCAGTTTATGT	CCTCCCAGTCTCCCCACT
SDHC-6	AAGGTGGGGCATAAGGGTAG	TCCCAGGCTGGAGATAAGAA
SDHD-1	TTCACCCAGCCATTTCTCTCCCT	GGGAGATCTCTTGAGGAGAAGAA
SDHD-2	CCTGGTCTTAACCTTCACAGTAACC	ATGGTCATGCCTTTAGCAGGACTT
SDHD-3	ATGTACACTGCCTGTCAGTTTGGG	TGAGGGAGAAGTTGATTGAAATGC
SDHD-4	GCAAACAGTGACAGTGGAGTGGCA	GCCTCCCAGCTTCTTATAAGACTC
SDH5-1	ACCTTCCGGCTCAGCTC	TATCGGGCAGACGAACTC
SDH5-2	GTTGACCTTCCCAGGCTC	GAGGTCAGCTGCTTTTCTG
SDH5-3	GGTTCAGAGAGACTCCCAGG	GCAACGAGAGTGAACTCAG
SDH5-4.1	CCCTGGTATAGGCTAACATCG	TGAGTACACTTGGGCTGAGG
SDH5-4.2	AGCTCTGAGCCTCAAAAGTG	GAAGACTGTAGGAATGAGGGG
TMEM2	cccctatctctggtgtcaa	ctggtccctggctatctctg
TMEM3	tggaatttgctccagctacc	gcctgctcagagaaaccaga
TMEM4	tctctgagaatggggtttgg	AGAGTCTCTCCTGGGGAAGG
MAX-1	ccgtgtgtgtgtgtgtgtg	gaggggaaggggaaggag
MAX-2	caccctccgcttctctg	agaataatgggattgcaacc
MAX-3	tgctgacagcgtgtactcc	ggcaaccatgctaccta
MAX-4	ctgcctggattgggtttta	ggaccaagcctgctactgag
MAX-5	caacaagcaagcccttagga	GGAGGATGAGACGATGGAGA

A *menin* negatív, *sporadikus előfordulású mellékpajzsmirigy daganatokban a MEN1* gén szomatikus mutációinak a vizsgálatához 4 darab 20 µm vastagságú formalin-fixált paraffinba ágyazott metszetből, ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega) kittel izoláltuk a DNS-t. A DNS fragmentáltsága miatt, a csírasejtes mutáció vizsgálatához használt primerek (20. táblázat) helyett új, általunk tervezett primereket használtunk (21. táblázat). A PCR reakciót követő PCR termék tisztítás és Sanger-féle szekvenálás megegyezett a csírasejtes mutáció vizsgálatban használt módszerrel.

20. táblázat: A *MEN1* gén csírasejtes mutációanalíziséhez használt primerek

Exon	Forward primer	Reverz primer
2.1 Rcl	5'ggA ACC TTA gCg gAC CCT3'	5'Rcl-AgT Agg TgA ggC CgC CAg 3'
2.2 Rcl	5'TCC CgA GCT CAC CTT CCA gC3'	5'Rcl-ATg gAg ggT TTT gAA gAA gT3'
3 Fcl	5'Fcl-CTg TTA AAg CAC AgA ggA CC3'	5'CAA ggC Tgg ggg gAg ggA AC3'
4 Fcl	5'Fcl-gAg ACA TAA TgA TCT CAT CC3'	5'AAg TCT ggC CTA gCC CAg TC3'
5-6 Fcl	5' Fcl- ggC TCA TAA CTC TCT CCT TC3'	5'CAC TgT Tag ggT CTC CCT TC3'
7 Rcl	5'gAT CCT CTg CCT CAC CTC CA3'	5'Rcl-gAg ggg AAg AAA ggA CAg gC3'
8 Rcl	5'gCC CgC CTC CAg CAA gCT gg3'	5'Rcl-CCA TCC CTA ATC CCg TAC3'
9Rcl	5'ATC TgT gCC CTC CCT TCC CC3'	5'Rcl-CTg TCA CCA CCT gTA gTg CC3'
10.1 Rcl	5'gCA ACC TTg CTC TCA CCT Tg3'	5'Rcl-gAA AgT gAg AgC ACT ggA CCC TC3'
10.2 Fcl	5'Fcl-AgC ACC CgC AgC ATC ACC AC3'	5'AAA ACA AgC ggT CCg AAg TC3'

21. táblázat:A *MEN1* gén szomatikus mutáció analíziséhez használt primerek szekvenciái

Primér neve	Forward primer	Reverz primer
MN-2.1	ttgccttcgagccgcccgc	tggtaggatgacgcggttg
MN-2.2	ggcttcgtggagcatttct	ctcagagatagaggacagg
MN-2.3	ttcacgcccagatccgagg	taagattcccactactggg
MN-3F	attacctccccctccacag	ctggggggaggggaacaatac
MN-4F	cataatgatctcatccccc	attggctcagccctcacctg
MN-5F	gttcgtggctcataactct	tggccacttccctctactga
MN-6F	ggcagcctgaattatgatcc	ttctgcaccctccttagatg
MN-7F	ggactcctgggatcttctgtg	atcctcactcctggatgacagtg
MN-8F	cagagacccactgctctca	ggctggagctccagccttc
MN-9F	ctgctaaggggtgagtaagagac	gtctgacaagcccgtggctgctg
MN-10A	tcacctgctctccactg	ccaggcccttgccagtgtct
MN-10B	ccaagaagccagcactggac	cactctggaagtggagcact
MN-10CF	ctgaagggtggcagcaggct	gtagtcactagggtggaca

IV.3.2. A *C4B* és a *CYP21A2* gének kópiaszám és a *CYP21A2* gén szekvenálása

A *C4* és *CYP21A2* gének kópiaszám meghatározását kvantitatív valós idejű PCR-el végeztük el. A *C4A* és *C4B* gének kópiaszámát külön reakcióelegyben került meghatározásra. A reakcióelegyben a szensz primér (Forward: 5' GCAGGA GACATCTAACTGGCTTCT 3') és antiszensz (Reverz: 5' CCGCACCTGCATGCTCCT 3') primérek mellett TaqMan Universal PCR

Master Mix (AmpliTaq Gold® DNAPolymerase, dNTPs with dUTP, Passive Reference, NoAmpErase UNG®) és 50 ng genomiális DNS volt. A *C4A* specifikus TaqMan próba VIC jelölésű (5' VIC-ACCCCTGTCCAGTGTTAG-MGB 3'; MGB: minor groove binding non-fluorescent quencher), míg a háztartási gén FAM-jelölésű volt. A referencia gén az RNase P Detection Mix (ABI Cat.No. 4316831) volt. A másik csőben a *C4B* specifikus Taq-Man próba volt FAM jelölésű (5' FAM-ACCTCTCTCCAGTGATAC-MGB3') és az RNase P volt VIC-el jelölve (RNase P Detection Mix; ABI Cat. No. 4316844). A reakció végtérfogat 25 µl volt.

A *CYP21A2* gén vizsgálatához több új módszert fejlesztettünk. Ezek közül a legfontosabb az ún. long PCR alapú haplotipizálás, amihez a teljes RCCX modul amplifikációját el kellett végezni (22. táblázat).

22. Táblázat: A *CYP21A2* gén ún. ún. long range PCR alapú haplotipizálásához alkalmazott primerek szekvenciái

Long-range PCR primer	Szekvencia 5'-3'
C4A_F	AGGACCCCTGTCCAGTGTTAGACA
C4B_F	CCAGGACCTCTCTCCAGTGATACATA
C4A_R	CGCACCTGCATGCTCCTGTCTAAC
C4B_R	CCGCACCTGCATGCTCCTATGTATC
HERV-K_F	TTGGGAGTCCTTTGTTTCGTTGGT
HERV-K_R	GACCCACTGCCTCCCTTTCCTGT
STK19_F	TGCCCGTGTTTCTGGAGACTTGTG
STK19P_R	AGGCAAACAGCAGCAGTCACATC
TNXA_F	GTGGAAGTGGCTGGTTGAGGTGACT
TNXB_R	GCAGCATGTGACTAAGAGCTTTCC
CYP21_F	GAAATACGGACGTCCCAAGG
CYP21_R	ACAGTGTAACAGGCAAGGGACT
CYP21A1P_F	ACCTGTCGTTGGTCTCTGCTC
CYP21A1P_R	CCTCAGCTGCTTCTCCTCGT

A *CYP21A2* gén kópiaszám meghatározáshoz a *CYP21A2*-F: GACCTGTCCTTGGGAGACTACT és a *CYP21A2*-R: CCTCAGCTGCATCTCCACGA oligonukleotid priméreket használtuk.

A *CYP21A2* génre specifikus szekvenálásokhoz a templátot *CYP21A2-re* specifikus nested PCR-el hoztuk létre. A *CYP21A2* gén 2-intronjának szekvenálásával a teljes *CYP21A2* gén karakterizálható volt. Az ehhez használt primerek szekvenciája a következő volt. SEQ_12F: GGCAGACT TTGCTGGC AGACCT és SEQ_16R: AGAACTCCTGGGTCAGCTGCTC.

A PhD munkám elején a *CYP21A2* gén klinikai szempontból legjelentősebb mutációit (8 bp. deléción, I172N, exon 6 cluster, p.V281L, p.L307insT, p.Q318* és p.R356W) allél-specifikus PCR-el határoztam meg. Ebben a vizsgálatban alkalmazott primereket a 23. táblázat tartalmazza.

23. táblázat: A *CYP21A2* leggyakoribb mutációi vizsgálatához használt primerek szekvenciája

Primerek	Szekvencia 5'-3'	CYP21A2 génmutációk
CYP55	CCTGTCCTTGGGAGACTACT	Nagy fragmens
CYP12	ACTGTGTTTACAGGGGGGAG	Nagy fragmens
CYP1	TTCAGGCGATTTCAGGAAGGC	Kis fragmens
CYP48	CAGAGCAGGGAGTAGTCTC	Kis fragmens
CYP92D	GAG CCT CCA CCT CCC	Pro31 vad
CYP92E	GGAG CCT CCA CCT CCT	Pro31Leu mutáns
CYP659G	ACC CTC CAG CCC CCA G	I2splice mutáns
CYP659H	ACC CTC CAG CCC CCA A	I2splice vad
CYP659I	ACC CTC CAG CCC CCA C	I2splice vad
CYP 1004D	CCG AAG GTG AGG TAA CAG <u>A</u>	Ile173 vad
CYP 1004H	CG AAG GTG AGG TAA CAG <u>T</u>	Ile173Asn mutáns
CYP 1388D	GCC TCA GCT GCA TCT CCA <u>A</u>	Val238 vad
CYP 1388E	GCC TCA GCT GCT TCT CCT <u>T</u>	Val238Glu mutáns
CYP 1688G	ACT GCA GCC ATG TGC AC <u>C</u>	Val281 vad
CYP 1688F	C ACT GCA GCC ATG TGC AA <u>A</u>	Val281Leu mutáns
CYP 1999F	TGG TCT AGC TCC TCC TG <u>G</u>	Gln319 vad
CYP 1999E	TGG TCT AGC TCC TCC TA <u>A</u>	Gln319stop mutáns
CYP 2113D	G GGC ACA ACG GGC CG <u>G</u>	Arg357 vad
CYP 2113C	AAG GGC ACA ACG GGC CA <u>A</u>	Arg357Trp mutáns

Minden Sanger szekvenálást BigDye Terminator Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) reagenssel készítettük. A szekvenálási reakciók kapilláris elektroforézisét ABI 310 vagy ABI31000 típusú szekvenátorokon futtatuk (Applied Biosystems). A *CYP21A2* intron 2 haplotípusok felállításához a PHASE software v2.1.1 [25,26]-et alkalmaztuk. Hardy-Weinberg equilibrium tesztelését Arlequin v3.5 szoftverrel, a kapcsoltsági vizsgálatokat DnaSP v5.10.01 szoftverrel, vizualizációját Haploview v4.2 programcsomaggal végeztük el.

IV.3.3. A glükokortikoid receptor (GR) génvariánsok vizsgálata

A *GR* gén *N363S* polimorfizmus vizsgálatára új módszert dolgoztunk ki, ami a korábban alkalmazott restrikciós fragment hosszpolimorfizmus (RFLP) módszert váltotta ki, egy enzimemésztést és egy agaróz elektroforézis költségét takarítva meg. A módszer során új allélspecifikus reverz primereket terveztünk, amelyek a 3'-végeken található nukleotidban térnek el egymástól: 336W: 5'-ATCCTTGGCACCTATTCCAAT-3'; 363M-5'-ATCCTTGGCACCTATTCCAAC-3'. A PCR elegyben a forward primer (2/4F: 5'-CCAGT AATGTAACACTGCCCC-3') 0,5 µmol/l koncentrációban volt jelen, a nem specifikus reverz primer (2/4R: 5'-TTCGACCAGGGAAGTTCAGA-3'), illetve az egyik allélspecifikus reverz primer (363W vagy 363M) pedig 0,25 µmol/l koncentrációban. Az új reakcióval nyert PCR termék minden esetben tartalmazott egy 357 bázispár méretű fragmenst, amely belső kontrollként szolgált, valamint a specifikus primer által felismert szekvencia jelenléte esetén (363W – aszparagin, 363M – szerin) egy allélspecifikus 306 bázispár méretű fragmenst.

A GR BclI polimorfizmus vizsgálatához új allél-specifikus módszert dolgoztunk ki, melynek részletezését az eredmények fejezetben ismerteték.

IV.3.4. A GR génexpressziós vizsgálata

GR α és GR β mRNS-ek mennyiségét kvantitatív valósídejű PCR-rel határoztuk meg. A GR α és GR β izoformák különálló detektálására primereket és próbákat terveztünk; GR α (Genebank azonosítószám: X03225) és GR β (Genebank azonosítószám: X03348). A GR α amplifikálása a következő primerekkel történt: GR α F, 5'-AACTGGCAGCGGTTTTATCAA-3' és GR α R, 5'-TGGAAGCAATAGTTAAGG-AGATTTTCA-3'. A TaqMan próba szekvenciája: FAM-CCACTTCATG-CATAGAATCCAAGAGTTTTGTCA-TAMRA. A GR β amplifikálása a következő primerekkel történt: GR β F, 5'-AACTG-GCAGCGGTTTTATCAA-3' és GR β R, 5'-TGTGAGATGTGCTTTCTGGTTTTAA-3', a TaqMan próba szekvenciája: FAM-CATAACATTTTCATGCATAGAAT-CCAAGAGTTTTGTCA-TAMRA. A primer párok jelölése FAM és TAMRA festékekkel történt (Genosys, Sigma).

IV.3.5. A circadián génexpresszió vizsgálata H295R mellékvesekéreg sejtvonalban

H295R sejteket Dulbecco's modified Eagle's médium és Ham's F12 Nutrient Mixture 1:1 arányú keverékében tartottuk fent, melyet 15mM HEPES-sel, 6,25 μ g/ml inzulinnal, 6,25 μ g/ml transferrinnel, 6,25ng/ml szeleniummal, 1,25mg/ml borjú szérum albuminnal (BSA), 5,35 μ g/ml linolénsavval és 2,5% Nu-szérummal egészítettük ki. Szérum sokk kísérletekben a sejteket 24 órás szérum éheztetést követően 30% Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékban inkubáltuk 2 órán keresztül, majd aktív széren átszűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékba helyeztük át. A GR α kísérletekben a sejteket 24 órás szérum éheztetést követően aktív széren átszűrt tápfolyadékba kerültek és vivőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-zal, 1 μ mol RU486-tal vagy 100nmol DEX és 1 μ mol RU486 kombinációjával kezeltük. A metyraponnal (100 μ mol) vagy metyrapon (100 μ mol) és RU486 (1 μ mol) kombinációjával történő kezelés során a sejtek előkezelése a fentebb részletezett módon történt. A sejteket a feltüntetett időpontokban kerültek begyűjtésre. Minden kísérletet három független biológiai mintán végeztük el.

IV.3.6. Glükokortikoid receptor béta izoformát (GR β) expresszáló sejtvonal létrehozása

Caco-2 és Caco-2GR β sejteket Minimum Essential Médiumban tartottam fenn, melyet 10% főtális borjú szérummal (FBS), 1mM nátrium-piruváttal, 0,1mM nem-esszenciális aminosavakkal és 1% penicillin/sztreptomycinnel egészítettem ki. A GR β klónozása a GR α izoformából történt, a közös α - β régiót célzó szenz oligonukleotid primer és a GR β szekvenciájára specifikus antiszenz primer segítségével. A PCR fragmentumokat pcDNA3.1 vektorokba klónoztuk. A plazmidok

bázissorrendjét direkt DNS szekvenálással ellenőriztük. A Caco-2 sejteket FuGene Transzfekciós Reagens használatával GR β -t tartalmazó plazmiddal vagy üres pcDNA3.1 plazmiddal transzfektáltam a gyártó használati utasításainak megfelelően. A klonális szelekció neomycin kezeléssel történt.

IV.3.7. A sejtciklus dependens gén és mikro-RNS expresszió vizsgálatban használt sejtenyészetek

Ebben a vizsgálatban munkánkat humán primer sejtenyészeten (bőrfibroblaszt – human dermal fibroblast from adult – HDFa, Gibco, Life Technologies) és sejtvonalakon (hormontermelő mellékvesekéreg-karcinoma sejtvonal – NCI-H295R és méhnyakrák sejtvonal – HeLa, American Type Culture Collection – ATCC) végeztük a forgalmazó protokolljainak megfelelően.

IV.3.8. Nagyáteresztőképességű mRNS és mikro-RNS expressziós mérések

A GR β géntranszkripcióban valamint a glükokortikoid érzékenységben betöltött szerepének vizsgálata során Caco-2 és Caco-2GR β sejteket 100 nmol DEX-al vagy vivőanyaggal 8 órát kezeltük. A mintákból RNS izolálást követően a teljes genom mRNS expresszió mérése Agilent44K cDNS microarray-en történt. A méréseket és az eredmények értékelését Agilent DNA Microarray Scanner and Feature Extraction 9.5.3. programmal végeztük. A microarray adatok további feldolgozása Genespring GX 12.5 program segítségével gyári beállítások mellett történt.

A sejtciklus során bekövetkező génexpressziós microarray vizsgálatokhoz 100 ng szortolt G1, S és G2 fázisú HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtekből származó RNS-t használtunk. Összesen 24 mintát vizsgáltunk (2 vagy 3 biológiai párhuzamos sejtenként és fázisonként) Agilent whole human genome 4x44K microarray lemezekken (Agilent Technologies) a gyártó protokolljainak megfelelően. Az adatok kiértékelése és statisztikai analízise GeneSpring 12.6 szoftverrel (Agilent Technologies) történt. Ebben a vizsgálatban is összesen 8 darab szortolt G1 (2 minta), S (3 minta) és G2 (3 minta) fázisú NCI-H295R sejtekből izolált RNS mintát kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) alapú TaqMan Low Density Array kártyával (TLDA, Applied Biosystems, Life Technologies) is vizsgáltuk, a gyártó előírásainak megfelelően. Az adatok megerősítéséhez újgenerációs szekvenálást is használtunk. A kis RNS szekvenálás Illumina Small RNA Sequencing platformon történt Hong Kongban (BGI Tech Solutions, Tai Po, Hong Kong). A könyvtárkészítés TruSeq Small RNA library preparation kittel történt (Illumina, San Diego, CA, USA). 50 bázispár single end read szekvenálást végeztünk Illumina HiSeq2000 platformon, majd 10 Mb tiszta read analízise történt meg (BGI Tech Solutions, Tai Po, Hong Kong).

A génexpressziós microarray eredményeinek validálásához mintánként 30 ng RNS-t írtunk át cDNS-re SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Life Technologies)

segítségével, a gyártó előírásainak megfelelően. A kiválasztott gének expressziójának méréséhez TaqMan Gene Expression Assay-eket használtunk (Applied Biosystems, Life Technologies).

A *hipofízis daganatok mikro-RNS expressziós mintázatát* TaqMan Low Density Array (TLDA) Human MicroRNA Panel v.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével, a gyártó előírásai szerint határoztuk meg. Az endogén kontroll kiválasztás Normfinder szoftverrel történt, a próba expressziójának stabilitási értékét a csoporton belüli és a csoportok (NFA és NH) közötti variancia alapján határoztuk meg. A legmegfelelőbb endogén kontroll kombinációt 3 háztartási mikro-RNS (MammU6, RNU44 and RNU48) értékének számtani közepe adta. Az expresszió mértékét minden esetben ddCT módszerrel határoztuk meg.

IV.3.9. Egyedi génexpressziós mérések validálása kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)

A *GR β géntranszkripcióban* valamint a glükokortikoid érzékenységből vizsgálata során a microarray eredmények validálása során első lépésben reverz transzkripciót végeztünk 1 μ g RNS-ből Superscript III Reverse Transcriptase Kit (LifeTechnologies, Carlsbad, USA) használatával. A kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) méréseket előre megtervezett TaqMan Gén Expressziós Array kártya felhasználásával ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) készüléken történt. Az eredményeket a belső kontrollként használt öt háztartási gén (glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*), 18S riboszomális RNS (*18S*), Béta-Aktin (*ACTB*), hipoxantin-foszforiboziltranszferáz 1 (*HPRT1*), transferrin receptor (*TFRC*)) mértani átlagához normalizáltuk. Néhány esetben a sejtdhézió-, sejtmigráció- és sejtproliferáció-asszociált gének validálása egyedi TaqMan próbák (LifeTechnologies); ((osteopontin (*SPP1*) [Hs00959010_m1], chitinase-3-like-1 (*CHI3L1*) [Hs01072228_m1] és vimentin (*VIM*) [Hs00958111_m1]) segítségével, 7500 Fast Real Time PCR készüléken (Applied Biosystems) történt. Ezen esetekben a génexpressziót a belső kontrollként használt Béta-Aktin-hoz (*ACTB*) normalizáltuk.

A *cirkadián ritmust követő génexpressziós mérésekhez* is teljes RNS-t használtunk, amit miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk. A reverz transzkripciót 1 μ g RNS-ből végeztük Superscript VILO Reverse Transcriptase Kit (LifeTechnologies), vagy Superscript III Reverse Transcriptase Kit (LifeTechnologies) használatával. A qRT-PCR-t TaqMan Gén Expressziós Assay-ek (LifeTechnologies) segítségével végeztük: Period 1 (*PER1*) [Hs01092603_m1]; Period 2 (*PER2*) [Hs00256143_m1]; Cryptochrome 1 (*CRY1*) [Hs00172734_m1]; Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (*ARNTL*) [Hs00154147_m1]; *REV-ERB α* [Hs00253876_m1]; nukleáris receptor 3 C1 (*NR3C1;GR*) [Hs00353740_m1]; Proopiomelanokortin (*POMC*) [Hs00174947_m1]; kortikotropin felszabadító hormon (*CRH*) [s01921237_s1]; és Béta-Aktin (*ACTB*) [Hs99999903_m1]). A valós idejű PCR

mérések 7500 Fast Real-Time PCR rendszeren (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) történtek, a gyártó utasításainak megfelelően. A génexpressziót a háztartási géneként használt Béta-Aktinhez (ACTB) normalizáltuk.

A *sejtciklus-dependens génexpresszió* nagy áteresztőképességű módszerrel kapott eredmények validálásához mintánként 30 ng RNS-t írtunk át cDNS-re SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Life Technologies) segítségével, a gyártó előírásainak megfelelően. A kiválasztott gének expressziójának méréséhez TaqMan Gén Expressziós Assay-eket (katalógusszám: 4331182; *ARHGAP11A* probe ID: Hs00207575_m1; *ASPM* probe ID: Hs00411505_m1; *KIF14* probe ID: Hs00208408_m1; *GTSE1* probe ID: Hs00212681_m1; *CDCA2* probe ID: Hs00299250_m1; *SKA1* probe ID: Hs00179514_m1; *CCNA2* probe ID: Hs00996788_m1; *AURKA* probe ID: Hs01582072_m1; *AURKB* probe ID: Hs00945858_g1; *CDK1* probe ID: Hs00938777_m1; *RRM2* probe ID: Hs00357247_g1; *ACTB* probe ID: Hs99999903_m1) használtunk (Applied Biosystems, Life Technologies).

A fold change (FC) számolása a $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ módszerrel történt. Minden mérést három párhuzamos mintán végeztünk el.

IV.3.10. Egyedi mikro-RNS expresszió mérés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)

A hipofízis és a szortolt sejtekből származó minták egyedi mikro-RNS-expressziójának méréséhez a TaqMan MicroRNA Assay Kit-ekben található stem-loop RT primereket és TM primereket használtunk. A mikro-RNS expressziós mérések validálásához 5 ng RNS írtunk át cDNS-re TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével a gyártó protokolljainak megfelelően. A mikro-RNS expressziót TaqMan MicroRNA Expression Assay-ekkel, 7500 Fast Real-time PCR műszeren. A génexpressziót az ACTB, a mikro-RNS expressziót az RNU48 relatív expressziójára normalizáltuk (ΔCt). Az expressziós eredményeket a fold change formulával kvantifikáltuk.

A *hipofízis minták egyedi mikro-RNS-expressziójának* méréséhez a TaqMan MicroRNA Assay Kit-ekben található stem-loop RT primereket és TM primereket használtunk: hsa-miR-135a (Assay ID: 000460), hsa-miR-135b (Assay ID: 4395372), hsa-miR-543 (Assay ID: 4395487), hsa-miR-422a (Assay ID: 4395408), hsa-miR-383 (Assay ID: 4373018), hsa-miR-378 (Assay ID: 4395354), hsa-miR-516a-3p (Assay ID: 4373183), hsa-miR-155 (Assay ID: 000479), hsa-miR-17-5p (Assay ID: 000393), hsa-miR-93 (Assay ID: 000432), hsa-miR-98 (Assay ID: 000577), hsa-miR-140-5p (Assay ID: 001187), hsa-miR-582-3p (Assay ID: 002399), hsa-miR-582-5p (Assay ID: 001983), hsa-miR-938 (Assay ID: 002181), RNU44 (PN: 4427975, Assay ID: 001094), RNU48 (PN: 4427975, Assay ID: 001006), U6 snRNA (MammU6, PN: 4427975, Assay ID: 001973). A

reverz transzkripciót TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit segítségével végeztük (PN: 4366596). Az RT mix 0,15 µl dNTP-t (100 mM), 1 µl MultiScribe reverse transcriptase-t (50U/l), 1,5 µl 10x RT Buffer-t, 0,19 µl RNase inhibitor-t (20 U/µl), 4,16 µl RNáz-mentes vizet, 3 µl miRNA specifikus stem-loop RT primert és 5 µl (10 ng) teljes RNS-t tartalmazott. Az RT-PCR reakcióelegye 1 µl RT terméket, 0,75 µl TM primer-t, 7,5 µl 2x TaqMan Universal PCR Master Mix-et, 5,75 µl RNáz-mentes vizet tartalmazott (15 µl végtérfogat). A reakció 384-well-es plate-en zajlott 7900 HT RealTime PCR rendszerben.

A *sejtciklus-dependens mikro-RNS* expressziós nagy áteresztőképességű módszerekkel kapott eredmények validálásához 5 ng RNS írtunk át cDNS-re TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével a gyártó protokolljainak megfelelően. A mikro-RNS expressziót TaqMan MicroRNA Expression Assay-ekkel (katalógusszám: 4427975; hsa-miR-10b probe ID: 002218; hsa-miR-128a probe ID: 002216; hsa-let-7g probe ID: 002282; hsa-let-7a probe ID: 000377; hsa-let-7e probe ID: 002406; hsa-let-7f probe ID: 000382; hsa-let-7i probe ID: 002221; hsa-miR-21 probe ID: 000397; hsa-miR-22 probe ID: 000398; hsa-miR-222 probe ID: 002276; hsa-miR-16 probe ID: 000391; hsa-miR-15a probe ID: 000389; hsa-miR-503 probe ID: 001048; hsa-miR-202 probe ID: 002363; hsa-miR-132 probe ID: 000457; hsa-miR-577 probe ID: 002675; hsa-miR-24-2* probe ID: 002441 és RNU48 probe ID: 001006) mértük (Applied Biosystems, Life Technologies). Háztartási mikro-RNS-ként az RNU48-t használtuk.

A *mellékpajzsmirigy daganatokban a MEN1 3'UTR-t célzó mikro-RNS-ek* vizsgálatához az RNS izoláláshoz minden mintánál 4 darab 20 µm vastagságú formalin-fixált paraffinba ágyazott metszetből, RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE tissues (Life Technologies by Thermo Fischer Scientific) kittel végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS-t -80°C-on tároltuk. A mintákban található össz-RNS koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértük. A reverz transzkripcióhoz 5 ng RNS-t használtunk templátként, az átírást TaqMan microRNA reverse transcription kittel (Applied Biosystems by Life Technologies) végeztük. A mintákat a további feldolgozásig -20°C-on tároltuk. A kiválasztott mikro-RNS-ek szintjét kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval mértük (7500 Fast Real-time PCR készülék, Applied Biosystems by Life Technologies), mikro-RNS-specifikus TaqMan próbákkal (próbák azonosítói: hsa-miR-24: 000402, hsa-miR-28: 000411, hsa-miR-326: 000542, hsa-miR-484: 001821, hsa-miR-637: 001581, hsa-miR-744: 002324, RNU6B: 001093, a gyártó az Applied Biosystems by Life Technologies). A vizsgálat során a referencia gén az RNU6B volt. A méréseket 2 technikai párhuzamossal végeztük el. A MEN1-asszociált és a sporadikus csoportok mikro-RNS expresszióját a $\Delta C_t(\text{sporadikus}) - \Delta C_t(\text{MEN-1 asszociált}) (\Delta \Delta C_t)$ egyenletet

alkalmazva hasonlítottuk össze. A fold change értékét ezekben az esetekben is $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ módszerrel számítottuk ki.

IV.4. Áramlási citométerrel végzett mérések

IV.4.1. Apoptózis, sejtciklus-disztribúciós és sejtproliferációs vizsgálatok

A daganatellenes szerek hormontermelő NCI-H295R sejtek apoptózisára és sejtciklusuk fázisaira gyakorolt hatását áramlási citometriával vizsgáltuk propídium-jodidos festést követően. A mintákat FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) mértük, egy méréshez legalább 10000 eseményt detektáltunk. Az eredményeket Cell Quest Pro és Winlist szoftverek segítségével értékeltük ki. Az egyes antineoplasztikus szerek proliferációra gyakorolt hatását alamarBlue sejtproliferációs reagenssel (DAL1025, Thermo Fischer Scientific), 96-lyukú tenyésztőedényben vizsgáltuk. Kezelésként és időpontonként nyolc párhuzamos mérést végeztünk. Az NCI-H295R hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon a gemcitabin (G, G6423, Sigma-Aldrich Chemical Co.), a mitotán (M, N12706, Sigma-Aldrich Chemical Co.) és a 9-cisz-reténsav (R, sc-205589A, Santa Cruz Biotechnology) önálló és kombinált adásának hatásait vizsgáltuk. A kezeléseket 24, 48 és 72 óráig alkalmaztuk. Kezelésként és időpontonként három (áramlási citometriás, génexpressziós és hormontermelési mérések) ill. nyolc (proliferációs assay) párhuzamos mérést végeztünk.

IV.4.2. Sejtciklus szerinti sejtválogatás fluoreszcencia alapján áramlási citométerrel

A HDFa, NCI-H295R és HeLa sejteket 150 cm^2 -s flasksban tenyésztettük 90%-s konfluenciáig. A sejteket Vybrant DyeCycle Orange (Molecular Probes, Life Technologies) DNS-festékkel jelöltük. Ez a festék sztöchiometrikusan képes jelölni a DNS-t a sejtek viabilitásának megváltoztatása nélkül. Az inkubációt sötétben, 37°C hőmérsékleten, párasított, 5% CO_2 -t tartalmazó inkubátorban 30 percig végeztük. Ezt követően 10 perc 1000 rpm fordulatszámon történő centrifugálás után a sejteket Ca^{2+} and Mg^{2+} nélküli, 2% magzati borjúsérumot tartalmazó Hank's Balanced Salt oldatban szuszpendáltuk (szort puffer), majd a szuszpenziót FACS Aria III sejt szorterrel (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) analizáltuk és szortoltuk. A szortolást megelőző analízishez 100000 eseményt detektáltunk, majd a G1 (egyszeres DNS tartalom), S (egyszeres és kétszeres DNS tartalom közötti intenzitás) és G2 fázisoknak (kétszeres DNS tartalom) megfelelő sejtpopulációkat különválogattuk. A szortolás maximum 30 percig tartott és minden szortolt populációt reanalizáltunk újabb áramlási citométeres analízissel. Az adatokat BD FACSDiva v6.1.3 szoftverrel analizáltuk (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A szortolást követő reanalízis után a sejteket centrifugáltuk (10 perc, 1000 rpm) jéghideg PBS hozzáadásával

mostuk, majd újra centrifugáltuk (10 perc, 1000 rpm), majd QIAzol lízis regaensben vagy Western blot lízis pufferben reszuspendáltuk és -80°C hőmérsékleten tároltuk az RNS és fehérje izolálásig.

IV.5. Glükokortikoid receptor béta izoformát (GR β) expresszáló sejtek szteroid érzékenysége vizsgálat

Caco-2 és Caco-2GR β sejteket 6-lyukú szövettenyésztő tálcákra 1×10^6 /lyuk sejtszámmal ültettük ki. A kísérletek előtt 24 órán keresztül a sejteket szérummentes tápoldatban tartottuk. A sejteket 100 nmol DEX-zal vagy vivőanyaggal 8 órát kezeltük. Teljes RNS izolálás RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével, teljes genom mRNS expresszió mérése Agilent44K cDNS microarray-en történt. A méréseket és az eredmények értékelését Agilent DNA Microarray Scanner and Feature Extraction 9.5.3. programmal elemeztük majd a microarray adatok további feldolgozása Genespring GX 12.5 program segítségével történt. Minden kísérletet három biológiai párhuzamos mintán ismételtünk meg.

IV.6. A *WEE1* 3'UTR feltételezett mikro-RNS kötőhelyének vizsgálata

A *WEE1* gén 3'UTR szabályozó régió szekvenciáját humán genomiális DNS-ből amplifikáltuk 5'-GCTCTAGAGCTACTCCTTTCCCACCTCC-3' forward és 5'-GCTCTAGAAAGCTCAGAGTGACTT-TTAATATGCC-3' reverz primerekkel, majd a szabályozó régiót 5'→3' irányban pGL3 Control vektorba (Promega, Madison, USA) illesztettük közvetlenül a luciferázt kódoló gén 3' vége mögé, XbaI restrikciós hasítóhelyet használva (pWee+). Az ellenkező orientációban (3'→5') beépült 3'UTR régiót használtuk negatív kontrollként (pWee-). A *WEE1* 3' UTR-en kötődő miR-128 és miR-516 kötőhelyek módosítását site-directed mutagenézissel hoztuk létre.

A funkcionális vizsgálatokhoz HeLa sejteket használtunk. A sejtek ko-transzfekciójához 100 nM premiR prekuzort (pre-miR miRNA Precursor Molecules: miR-20a, miR-93, miR-128a, miR-155, miR-516a-3p; Ambion Inc, Austin, USA) vagy negatív kontroll prekuzor mikro-RNS-t (Negative Control #2 Precursor miR; Ambion Inc, Austin, USA) és 150 ng vad típusú (pWee+) vagy negatív kontroll (pWee-) firefly luciferáz vektort és transzfekciós kontrollként 150 ng renilla luciferáz vektort (pRL-TK, Promega, Madison, USA) használtam. A transzfektáláshoz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) reagenst alkalmaztunk a protokoll előírásai szerint. A luciferáz assay-t a transzfekciót követően 24 órával mértem Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) segítségével mikrotiter plate olvasón (Appliskan 2.3; Thermo Fisher Scientific, Finland) a megadott paramétereknek megfelelően. A firefly luciferáz aktivitásokat a transzfekciós kontrollként használt renilla luciferáz értékekre normalizáltuk.

IV.7. Fehérje expresszió mérések Western blottal

IV.7.1. Mikro-RNS prekursorok transzfekcióját követő WEE1 fehérje expresszió mérése

HeLa sejteket 100 nM pre-miR prekuzorral (Ambion Inc, Austin, USA) transzfektáltuk, majd 48 órával később a sejteket 50 µl 2x Laemli Sample Buffer-ben (Bio-Rad, Philadelphia, PA USA) learattuk és teljes sejtlyázátumot Western blot-tal analizáltuk. A WEE1 fehérjét 1:1000 hígítású anti-WEE1 (cat. Nr: 4936; Cell Signaling, Beverly, USA) és 1:7000 hígítású anti-nyúl-tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) mutattuk ki. A membránokat lemosás (30 perc, 0,1M Glicin, pH: 2,6) után egér monoklonális anti-aktin elsődleges (ab8226; Abcam; hígítás 1:2000, Abcam), majd anti-egér tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel (A9917; Sigma-Aldrich; hígítás: 1:20000) inkubáltuk. A fehérjesávokat ECL-Plus reagenssel hívtuk elő (Amersham Biosciences, Pittsburg, USA). A sávok denzitometriás értékelését QuantityOne 4.6.7 (BioRad) szoftverrel végeztük el, a koncentrációkat az aktin koncentrációjára normalizáltuk.

IV.7.2. Az áramlási citométerrel szortolt sejtek foszfo-CDC2 és RRM2 tartalma

A H295R szortolt sejteket Western blot lízis pufferben szuszpendáltuk és -80°C hőmérsékleten tárolt mintákból 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe, majd Mini Protean elektroforézis kádban (Bio-Rad) választottuk szét a fehérjéket nagyság szerint. Ezt követően egy éjszakányi 4°C hőmérsékleten történő blottolás során polivinildién-fluorid (PVDF) membránra vittük át a mintát, melynek sikerességét Ponceau festéssel verifikáltuk. A membránok blokkolását követően elsődleges nyúl anti-foszfo-CDC2 (Tyr15) antitesttel (Cell Signaling Technology) vagy kecske anti-RRM2 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846) inkubáltunk. A másodlagos antitestek anti-nyúl (Cell Signaling Technology) vagy anti-kecske (DAKO) voltak. Háztartási fehérje β-aktin volt, amit anti-β-aktin antitesttel (Cell Signaling Technology) detektáltuk.

IV.8. Hormonmeghatározások az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából

A kezeléseket követően a gemcitabin (G) és a mitotán (M) kortizoltermelésre való hatását vizsgáltuk folyadékkromatográfiát követő tömegspektrometriai módszerrel (LC-MS). Az LC-MS mérést Perkin-Elmer Flexar FX10 UHPLC-hez kapcsolt Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométeren, a multiple reaction monitoring mode (MRM) alkalmazásával végeztük.

IV.9. Sporadikus hipofízis, sporadikus mellékvesekéreg és MEN1-hez társult valamint sporadikus mellékpajzsmirigy daganatokon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok

IV.9.1. Hipofízis szövetekben a WEE1 fehérje kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal és

Western blottal

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz összesen 21 formalinban fixált, paraffinba ágyazott hipofízis szövetmintát használtunk (9 NFA, 7 GH±PA, 5 NH). Mikrohullámos antigén feltárást (15 perc, 0,1 mM pH=6 citrát puffer) követően az immunfestés egy éjszakán át 1:100 hígítású anti-WEE1 (ab37597, Abcam, Cambridge, USA), 1:400 hígítású anti-phosphoWEE1 (ab60034, Abcam) antitestekkel és anti-nyúl másodlagos antitesttel (Biogenex, San Ramon, CA, USA) történt. Az immunreakció intenzitását 4-es skálán határoztuk meg: 0 (negatív), 1+ (gyenge), 2+ (mérsékelt), 3+ (erős). Az anti-WEE1 antitest specificitását frissen fagyasztott hipofízis szövetmintákban határoztuk meg. A minta homogenizálása után a T-PER tissue Protein Extraction Reagenssel (Pierce, Rockford, IL, USA) izolált fehérje koncentrációját BCA Protein Assay kittel (Pierce) kvantifikáltuk. Az elektroforézishez mintánként 30 ng teljes fehérjét használtunk 10 %-os poliakrilamid gélben, majd a méret szerint szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át (Millipore, Billerica, MA, USA) semi-dry transfer cell segítségével (BioRad). A WEE1 fehérjét 1:500 hígítású anti-Wee1 (ab37597, Abcam) és 1:7000 hígítású anti-nyúl-tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel (sc-2004; Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA) detektáltuk.

IV.9.2. A ribonukleotid reduktáz 2-s alegységének (RRM2) kimutatása mellékvesekéregrákban

Az RRM2 a mellékevesekéreg karcinómák proliferációs aktivitásának függvényében való kifejeződését 12 humán mellékvesekéreg-karcinóma szövetmintán vizsgáltuk. A vizsgálatra kiválasztott, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében őrzött, formalinban fixált, paraffinba ágyazott daganatok korábbi, rutin szövettani diagnózisa megerősítette a mellékvesekéreg-karcinóma diagnózist. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a Ki67 proliferációs marker és az RRM2 kifejeződését vizsgáltuk. A detektáláshoz nyúl anti-Ki67 antitesttel (SP6 klón, katalógusszám: RM-9106, Thermo Scientific, hígítás: 1:100), míg az RRM2 kimutatásához kecske anti-RRM2 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:100, hőmérséklet: 4°C) végeztük.

IV.9.3. A menin expressziójának vizsgálata mellékpajzsmirigyek daganatokban

A menin fehérje kifejeződését 3-4 µm vastagságú metszeteken történtek. EZ Prep Concentrate 10X (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)-al történt deparaffinálást követően az endogen peroxidase blocking és antigén eltávolítást követően (CC1, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) anti-Ki-67

ellenanyaggal (Clone MIB-1) (DAKO, Glostrup, Denmark, Cat. No.: M7240) 1:200-as hígításban 42°C 30 percig történt az inkubálás. Hasonló előkészítést követően a menin expresszió méréséhez nyúl poliklonális menin antitestet (Abcam, Cambridge, UK, cat. No.: ab2605) használtunk 1:100-as hígításban 42°C 32 percig. Az immunhisztokémiai festés HRP konjugátummal került előhívásra Ventana automatizált rendszerben (Ventana Benchmark XT automate, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A vizualizációhoz UltraView™ Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)-et alkalmaztunk. Pozitív kontrollnak humán hasnyálmirigy és normális mellékpajzsmirigy szöveteket használtunk a menin, és nyirokcsomót a Ki-67-es festéshez. Negatív kontrollként az elsődleges antitestek helyett antitest oldószert (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) alkalmaztunk. A Ki-67 és menin immunreaktivitást tapasztalt patológus (dr. Borka Katalin, SE. II. Sz. Patológiai Intézet) értékelte. A Ki-67 pozitivitást a magi pozitivitás, míg a menin fehérje expresszióban mind a magi mind pedig a citoplazmatikus festődés értékelésre került egy 4 pontos skálán (0=nincs festődés, 1=gyenge, 2=közepes, 3=erős).

IV.10. BIOINFORMATIKAI VIZSGÁLATOK

IV.10.1. *A mikro-RNS-ek és a cél (target) mRNS-ek közötti interakció feltérképezése*

A hipofízis daganatok mikro-RNS expressziója vizsgálata során a mikro-RNS-ek cél mRNS-einek azonosításához interneten elérhető programok közül a TargetScan, PicTar és miRBase Targets algoritmusokat használtuk. A potenciális mikro-RNS-ek közül, azokat választottuk ki, amelyeket mindhárom program előre jelzett, vagy az adott mikro-RNS több kötőhellyel rendelkezett a *WEE1* 3' UTR régióban. A pGL3 Control plazmid és a miR-155 interakciójának modellezéséhez RNA22 target predikciós programot használtunk, amely tetszőleges beviteli (input) szekvenciák közötti modellezést is lehetővé tesz, a fenti algoritmusokhoz képest, amelyek meghatározott DNS adatbázisok 3'UTR szekvenciáit használják.

A *MEN1* 3'UTR-t célzó mikro-RNS-ek beazonosítására öt internetes adatbázis segítségével választottuk ki a *MEN1* gént illetve a menint potenciálisan targetáló mikro-RNS-eket. A használt adatbázisok a következők voltak: Diana microT 3.0 URL: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>, miRWalk URL: <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>, microCosm Targets 5.0 URL: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>, PicTar URL: <http://pictar.mdc-berlin.de/>, TargetScan URL: <http://www.targetscan.org/>.

IV.10.2. *Hipofízis daganatok funkcionális genomikai analízise*

Az útvonalelemzéshez a TLDA mérések alapján szignifikánsan felülexpresszált mikro-RNS-ek expressziós adatait használtuk a DIANA-mirPath online szoftver segítségével. A target predikcióhoz a TargetScan v5 algoritmust használtuk. A programcsomag mikro-RNS-ekre

prediktált multiplex célgénekre „gene set enrichment” analízist végzett Pearson’s Chi-négyzet próbával és a mikro-RNS-ekhez prediktált génszettekkel illesztette a KEGG útvonalakhoz. A KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisa and Goto, 2000) adatbázis különböző genomok tulajdonságait és biológiai rendszerekkel való összefüggését tartalmazza, szisztematikusan rendszerezi a molekuláris és rendszer-biológiai ismereteket, tapasztalatunk szerint az egyik legjobban használható adatbázis.

IV.10.3. *A GR β -t fokozott expresszió által befolyásolt gének útvonalelemzése*

A GR β overexpresszió valamint a Dexametazon kezelés során azonosított mRNS halmazokat és a metaanalízis eredményeit útvonalelemzésnek vetettük alá (Ingenuity Pathway Analysis (IPA)). Az IPA a génexpressziós eredményeket az adatbázisára vetítve jelöli ki az érintett patogenetikai utakat és hálózatokat.

IV.10.4. *A sejtciklus dependens expressziót mutató gének útvonal elemzése*

A sejt szortolás eredményeinek összehasonlítását elvégeztük a korábbi, szinkronizáció-alapú mérésekkel nyert primér humán fibroblasztok szinkronizációs módszerrel vizsgált sejtciklusdependens génexpressziójának microarray adatait feldolgozásával is. Az adatok a European Bioinformatics Institute Array Express adatbázisából (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-TABM-263/>), a HeLa sejteken végzett vizsgálatának eredményeit a <http://genome-www.stanford.edu/Human-CellCycle/HeLa/> honlapról töltöttük le. A vizsgálatunkhoz a szabadon elérhető DAVID Bioinformatics Resources 6.7 verzióját (<https://david.ncifcrf.gov/>) használtuk. A betöltött génlisták a HeLa sejtciklus szort módszerre specifikus (HeLa SZORT \ HeLa szinkr.), a HeLa szinkronizálás módszerre specifikus (HeLa szinkr. \ HeLa SZORT) és a mindkét vizsgálatban átfedő (HeLa SZORT $\cap$ HeLa szinkr.) sejtciklusdependens expressziót mutató gének listái voltak. A Bonferroni-korrigált $< 0,05$ p-értékű találatokat tartottuk szignifikánsnak.

IV.11. STATISZTIKAI ANALÍZIS

A genetikai asszociációs vizsgálatok során a Hardy-Weinberg egyensúly és a csoportok közötti megoszlások vizsgálatára Chi négyzet vagy Fischer tesztet használtunk. A mennyiségi változók összehasonlításához ANOVA, Student T-teszt, vagy Mann-Whitney tesztek alkalmaztunk.

Az mRNS és mikro-RNS expressziós microarray mérések kiértékelését GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies) szoftverrel, egyutas ANOVA elemzést követően Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt és Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. A TLDA vizsgálatok kiértékelését Real-Time StatMinerTM (Integromics, Granada, Spanyolország) szoftver felhasználásával, egyutas ANOVA módszerrel végeztük. Az újgenerációs szekvenálási

eredmények kiértékelését edgeR programcsomag (3.8.6 verzió) használatával, T-tesztet követő Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. Az univerzális sejtciklus-gének különböző fázisokban való expressziójának ill. a fázisok közötti dinamikus expresszió-változásainak összehasonlításához Student-féle T-próbát alkalmaztunk. Az egyedi qRT-PCR validálások eredményeinek kiértékelése során az egyes csoportok közötti összehasonlításra Student-féle T-tesztet alkalmaztunk. A korrelációs vizsgálatokra Pearson- és Spearman-féle módszereket alkalmaztunk. A sejtenyészeteken végzett kezelések hatását a proliferációra, a médium kortizol koncentrációra, az apoptózis arányára, valamint a sejtciklus fázisainak eloszlására vonatkozóan Student-féle T-teszttel vizsgáltuk. Minden összehasonlításban a p -érték $< 0,05$ eredményt fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Kutatómunkám során a hormonrendszer daganatainak a háttérben álló molekuláris mechanizmusok megismerését vizsgáltam. Összehasonlítva egyéb szervekkel **a hormonrendszer daganatai jelentős százalékban alakulnak ki egy-egy örökletes géneltérés talaján**, ami fontos abból a szempontból, hogy mint örökletes kórképek a mutációt hordozók beazonosíthatóak és preventív beavatkozásokkal a daganatok megelőzhetőek. Ugyanakkor, kutatási célpontnak is ideálisak, hiszen az adott génhibához társuló molekuláris mechanizmusok megismerését célzó vizsgálatához pontos támpontot és a mutációt hordozó daganatszövetek fontos kutatási mintákat jelentenek. Kutatómunkám két fő pilléren áll: **először molekuláris genetikai vizsgálatokkal beazonosítottuk azokat a hazai betegeket, akik valamilyen örökletes endokrin tumorszindrómában szenvednek**, majd genotípus-fenotípus összefüggések feltárásával új, a klinikai kezelésüket is befolyásoló, összefüggések ismertünk meg.

Kutatásom során a második pillér **a sporadikus daganatokban** zajló mechanizmusok megismerése volt. Ehhez a feladathoz **integrált adatelemzést**, azaz több szintről származó, legtöbbször az ingyenesen elérhető adatok feldolgozásán alapuló, bioinformatikai/statisztikai elemzéseket is végeztünk, amelyek segítségével szűkítettük a későbbi célzott funkcionális genetikai vizsgálatainkhoz a célpontokat. Ezek a vizsgálatok főleg alapkutatás jellegűek voltak, amelyek révén számos új, molekuláris mechanizmust ismertünk meg. A kapott eredményeim közül számos bekerült a mindennapi klinikai munkába mint új diagnosztikai és prognosztikai markerek. A transzlációs kutatások eredmények közül számos új molekuláris mechanizmust sikerült beazonosítanunk és számos olyan epigenetikai vagy fehérje alapú molekulát azonosítottunk, amelyeknek diagnosztikai vagy terápiás szerepe is lehet.

V.1. Örökletes endokrin tumorszindrómák patomechanizmusai, genotípus-fenotípus összefüggések

V.1.1. A *RET* protoonkogén mutációk geno-fenotípus összefüggései MEN2 szindrómában

Összesen 18 családból 40 örökletes medulláris pajzsmirigyrákos (MTC) betegben végeztük el a *RET* protoonkogén 10-16-os exonok mutációanalízisét, hagyományos, PCR reakciót követő bidirekcionális DNS szekvenálással (**24. táblázat**). Egy betegben a 16-os exon Met918Thr mutációt igazoltuk, ami MEN2B fenotípussal járt. A legnagyobb csoportot (15 család 33 tagja) a MEN2A fenotípus jelentette, amit a 11-es exon mutációk és a 10-es exon Cys609Ser mutáció okozott. A 14-es exon mutációi gyakran csak MTC-vel társultak, egyetlen egy Val804Met mutációt hordozóban igazoltunk primér mellékpajzsmirigy (HPT) hiperpláziát. Eredményeink összhangban voltak az irodalmi adatokkal, a legsúlyosabb fenotípus, a legagresszívebb MTC a 16-os exon mutációk esetén

várható, míg a 10-es és 11-es exonok eltérései során Phaeo és HPT is a klinikai manifesztációk része.

24. Táblázat: hazai MEN2A, FMTC, MEN2B szindrómában szenvedő betegekben azonosított RET mutációk

RET mutáció	MEN2A	FMTC	MEN2B	Gyakoriság
Exon 10				
TGC609TCC (Cys-Ser)	+	–	–	5.5%
TGC609TAC (Cys-Tyr)	–	+	–	5.5%
Exon 11				
TGC634TTC (Cys-Phe)	+	+	–	27.7%
TGC634TAC (Cys-Tyr)	+	+	–	16.6%
TGC634AGC (Cys-Ser)	+	–	–	5.5%
TGC634CGC (Cys-Arg)	+	–	–	11.1%
TGC634TGG (Cys-Trp)	–	+	–	5.5%
Exon 14				
GTG804ATG (Val-Met)	+	+	–	11.1%
GTG804TTG (Val-Leu)	–	+	–	5.5%
Exon 16				
ATG918ACG (Met-Thr)	–	–	+	5.5%

25. Táblázat: A hazai RET mutációt hordozó betegek főbb klinikai eltérései

	Exon 10			Exon 11				Exon 14		Exon 16
	609 Ser	609Tyr	634Phe	634Tyr	634Ser	634Arg	634Trp	804Met	804Leu	918Thr
Betegek száma	3	2	9	9	4	2	2	4	4	1
Családok száma	1	1	5	3	1	2	1	2	1	1
Életkor a diagnóziskor év (tartomány)	35	41	43	27	41	28,5	35	38	44	18
	(15–48)	(27–55)	(9–67)	(16–51)	(33–51)	(22–35)	(16–55)	(34–45)	(33–55)	
Unifokális MTC	1	–	–	–	1	–	1	2	–	–
Multifokális MTC	1	2	9	7	1	2	1	1	4	1
C-sejt hiperplázia	1	2	2	3	3	–	–	1	1	–
Nyirokcsomó metasztázis	–	–	–	2	2	1	1	–	–	1
Távolis metasztázis	–	–	–	3	2	–	1	–	–	1
Halálozás MTC-miatt	–	1	–	–	–	–	1	–	–	
Serum calcitonin, átlag és SD pg/ml	247 ± 383 (n = 3)	420 n=1	705 ± 1028 (n = 6)	864 ± 1531 (n = 4)	835 ± 612 (n = 4)	1000 n=1	648 n=1	115 ± 106 (n = 2)	293 ± 474 (n = 4)	2200 n=1
Phaeochromocytoma	2	–	7	2	3	2	–	–	–	–
Kétoldali Phaeo	–	–	3	2	3	2	–	–	–	–
Hiperparatireózis	–	–	2	–	–	–	–	1	–	–

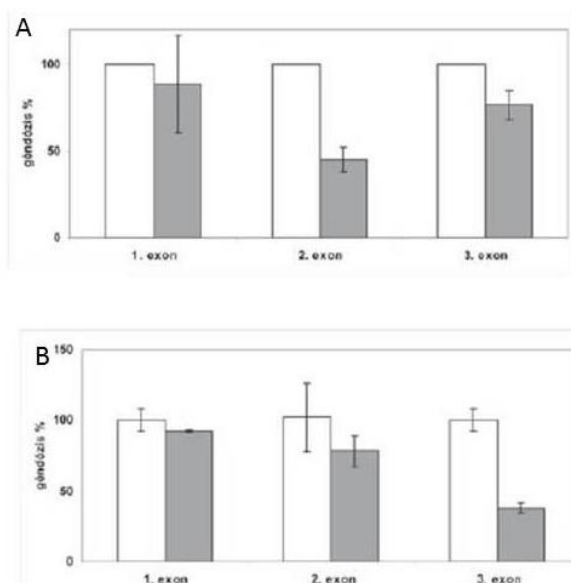
Betegeinkben igazolt fenotípus jegyek hasonlóak az irodalomban közöltekhez. Halálozás mindösszesen két esetben következett be MTC miatt, ami szintén alátámasztja azt a megfigyelést,

hogy az örökletes MTC agresszivitása elmarad a sporadikus - RET-negatív - esetek halálozásától [2]. A Phaeo és hiperparatireózis gyakorisága némileg elmaradt az irodalomban közltekől, de nem zárható ki, hogy saját betegeinkben a későbbi életkorban ezek a manifesztációk is megjelennek (**25. táblázat**) [435].

A hazai adatainkat kiegészítve a nemzetközi adatokkal számos új megfigyeléseket és összefüggéseket azonosítottunk, amelyeket a **VI.1.11.** pontban részletezem.

V.1.2. A *VHL* gén eltérései hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegekben

A von Hippel-Lindau (VHL) szindróma egy ritka, több szervet érintő, autoszóm dominánsan öröklődő kórkép. Munkám során a hazai VHL szindrómában szenvedő betegek mutációvizsgálatát végeztük el. Hét család 35 tagja és 37 látszólag sporadikus megjelenésű Phaeo-val került kivizsgálásra. Betegség-okozó mutációt mind a hét VHL szindrómában szenvedő családban és 3 Phaeo-s betegben sikerült detektálnunk. A pontmutációk mellett két nagy és egy 2 bázist érintő deléció is kimutattunk. A genotípus-fenotípus adatokból kitűnik, hogy a deléciókkal és Stop kodont eredményező mutációk során a VHL szindróma 1-es típusa (nincs Phaeo) a klinikai megjelenés, míg aminosavcserével járó pontmutációk a VHL szindróma 2-es típusát eredményezik. A kutatómunka során szükséges volt az ún. nagy géndeléciók detektálásnak kidolgozása is mert a VHL szindrómáért felelős génelterések kb. 10-15 % ilyen hiba, és ezeket DNS szekvenálással nem lehet azonosítani. Erre kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót és multiplex ligációs próba amplifikációt (MLPA) végeztünk (**14. ábra**) [436].



14. Ábra: a *VHL* gén nagy delécióinak kimutatásában használt módszerek. A panel: az MLPA módszerrel igazolt 2-es exon deléció, B panel: kvantitatív valós idejű PCR-el igazolt 3-as exon deléció

A nagy deléció vizsgálat bevezetésével az 1998-2009-es időszakban a hét VHL szindrómában szenvedő családból 2 esetben (28,5%) találtunk meg a kórképért felelős nagy deléciókat, ami megerősítette az irodalmi adatok alapján várható gyakoriságot és felhívja a figyelmet arra, hogy a molekuláris biológiai módszereket egymással kiegészítve kell alkalmazni a klinikai genetikai vizsgálatok során.

26. Táblázat: Hazai VHL szindrómás és látszólag sporadikus Phaeo-ban szenvedő betegek VHL gén mutációanalízisének valamint a klinikai fenotípus eredményei

Családok	Családtagok	Veserák (életkor)	KI haemangioblastoma (életkor)	Phaeochromocytoma (életkor)	Retina érintettség (életkor)	Egyéb	VHL génhiba	VHL altípus
A	Proband	-	39	-	22	Vese ciszta	L158V	1
	Fia	-	-	-	6	-	L158V	
B	IP	-	27	-	19	Vese és pancreas ciszta, polyglobulia	R161X	1
C	IP	35, kétoldali	33	-	-	Vese és pancreas ciszta	3-es exon deléció	1
D	IP	-	22	-	22	Vese és pancreas ciszta accessorikus lép	2-es exon deléció	1
E	IP	21				Vese ciszta, veserák, KI haemangioblastoma	354_355delCT	1
F	IP	-	-	27	27	Patkóvese	R167Q	2B
	Anyja	49	-	-	-	-	R167Q	
G	IP	40, kétoldali	42	34	-	-	S80I	2B
	Nagynéni 1 ^b	45, kétoldali	-	-	-	-	S80I	
	Nagynéni 2 ^b	-	-	-	-	Pancreas neuroendokrin tumor	S80I	
	Unokatestvér 1	-	37	-	18	-	S80I	
	Unokatestvér 2	-	38	39	29	-	S80I	
	Unokatestvér 1	-	22	-	23	Vese ciszta	S80I	
	Unokatestvér 2	-	-	10, kétoldali	26	-	S80I	
H	IP	19	-	19	-	Mellékhere ciszta	nem igazolódott	2B
LSP1	Proband			59			L63P	2C
LSP2	Proband			55			Y156C	2C
LSP3	Proband			25			R167G	2C

KI: központi idegrendszer

Az összesen 10 betegségkókozó mutáció között található 1 nonsense (R161X), 6 missense (L158V, R167Q, S80I, L63P, Y156C és R167G), 1 kis deléció (354_355delCT) és 2 nagy géndeléció. Ezek mellett egy benignus VHL génvariáns (P25L) is kimutatásra került (**26. táblázat**). Ezen genetikai eltérések a teljes VHL génben elszórtan találhatóak meg és nem ismétlődnek családok között, vagy tömörülnek mutációs hot spot-ba (**16. ábra**). A csonkolt, vagy hiányzó VHL fehérjét eredményező génmutációk csak a VHL-szindróma 1-es típusába sorolt családoknál fordultak elő, míg a missense mutációk döntően, de nem kizárólag a VHL-szindróma 2B és 2C típusában. A hazánkban tapasztalt mutációs spektrum lényegesen nem különbözik a nyugati, japán, vagy kínai populációkban találtaktól [67,437]. Az egyik legnagyobb beteganyagot feldolgozó

tanulmányban 6 mutációs hot spot-ot azonosítottak, melyek közül kettő (R161X és R167Q) a saját beteganyagban is fellelhető volt [65].

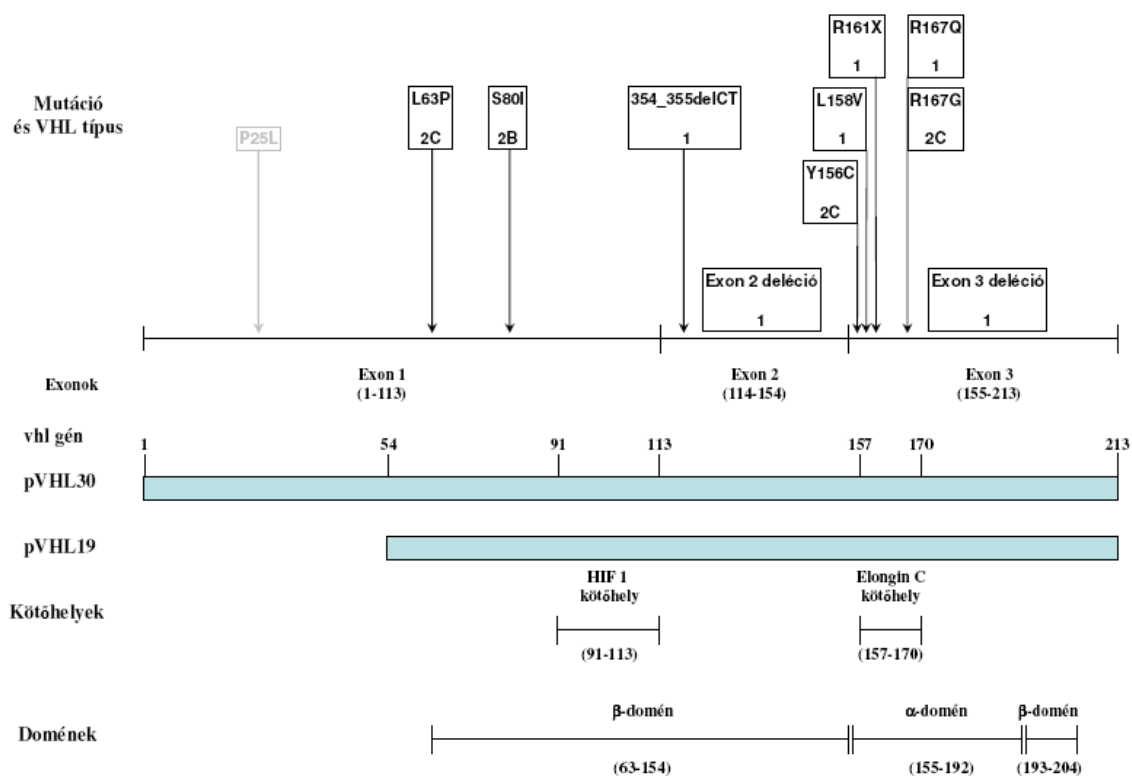
A beazonosított mutációk közül egy, a c.354_355delCT volt új mutáció. Ez és az R161X mutáció is csonkolt, jelentősen károsodott működésű VHL fehérjét eredményez, ami patogénnek tekinthető. A két különböző nagy géndelécio szintén súlyos funkcionális következménnyel járt, betegeinkben a VHL-szindróma 1-es típusát okozta. Ez az összefüggés is megfelel az irodalmi adatok alapján vár összefüggésnek, de találkozhatunk belga és lengyel családokkal ahol ún. csak központi idegrendszeri haemangioblastomaként („CNS (central nervous system) haemangioblastoma only”) manifesztálódó kórformát mutattak ki nagy géndeléciohoz társulva [438,439].

Az R161X csonkoló mutációt hordozó, fiatal, VHL-szindróma 2-es típusába sorolt index betegben enyhe polyglobulia is jelen volt. Ennek hátterében veseeltérést és inadekvát eritropoietin (EPO) túlprodukciót nem tudtunk kimutatni. A *VHL* gén mutációit leírták Chuvash-polycythaemiában, amiben a VHL-szindrómához kapcsolódó tumorok nem fordulnak elő [440–446]. Az alapvető genetikai különbség a két betegség között az, hogy míg a VHL-szindróma autoszomális domináns módon addig a Chuvash-polycythaemia autoszomális recesszív módon öröklődik, így a betegekben csírasejtesen homozigóta, vagy compound heterozigóta *VHL* mutációt lehet azonosítani. Betegünk esete kapcsán felmerül, hogy a polyglobulia kimutatásának esetleg szerepe lehet a VHL-szindróma fenotípus előrejelzésében [447,448]. Az irodalmi adatok feldolgozása során nem találtunk olyan közleményt, amelyben olyan módon vizsgálták volna erythrocytosis jelenlétét VHL-szindrómában, hogy azt nagy valószínűséggel nem renalis eredetű EPO túltermelés okozta volna, habár a betegek 5-20 százalékában erythrocytosis előfordulásáról számoltak be. Arról nem sikerült irodalmi adatot találni, hogy a homozigóta *VHL* mutáció miért nem okoz tumorképződést Chuvash-polycythaemiában.

További érdekes manifesztáció volt az egyik R167Q mutációt hordozó betegben kimutatott patkóvese, ami extrém ritkán fordul elő VHL-szindrómában [449]. Ennek oka lehet, hogy az embrionális fejlődés korai szakaszában a mesonephros caudalis irányú vándorlásának rendellenességeként alakul ki a patkóvese, amiben a VHL fehérjének is szerepe lehet [450].

VHL-szindrómás családok vizsgálatakor a Phaeo előfordulása 30% körüli [39], melynek saját eredményeink is megfelelnek: 7 családból 3, 18 klinikailag érintett egyén közül 5 esetben mutattuk ki. A látszólag sporadikus Phaeo esetében a *VHL* gén defektusai 0-11 százalékban igazolhatóak [56,76,451,452]. Azokban a tanulmányokban, amelyek ennél nagyobb gyakoriságról számoltak be [453], az adott populációban tapasztalt VHL mutáció alapító hatásának” (founder effect) tulajdonítható [454]. Saját eredményeink is a 10% körüli prevalenciát mutatták, a 37, egymással rokoni kapcsolatban nem álló egyén közül 3 esetben (8,1%) találtunk csírasejtes *VHL*

gén mutációt szövettani vizsgálattal igazolt, sporadikus, egyoldali Phaeo-ában. Mindhárom egyénnél különböző mutációt (L63P, Y156C és R167G) találtunk, mely alapján az „alapító hatás” lehetősége elvethető volt. Ezen mutációkat korábban VHL-szindróma esetén írták le. Az R167 aminosavat érintő missense jellegű mutációk VHL-szindrómában gyakran társulnak Phaeo-hoz [68], mely esetünkben R167G kapcsán Phaeo-hoz, az R167Q kapcsán VHL-szindróma 2-es típusaként jelentkezett.



15. Ábra: A hazai VHL szindrómában betegekben igazolt VHL mutációk funkcionális következményei a VHL fehérjén belüli elhelyezkedésük alapján

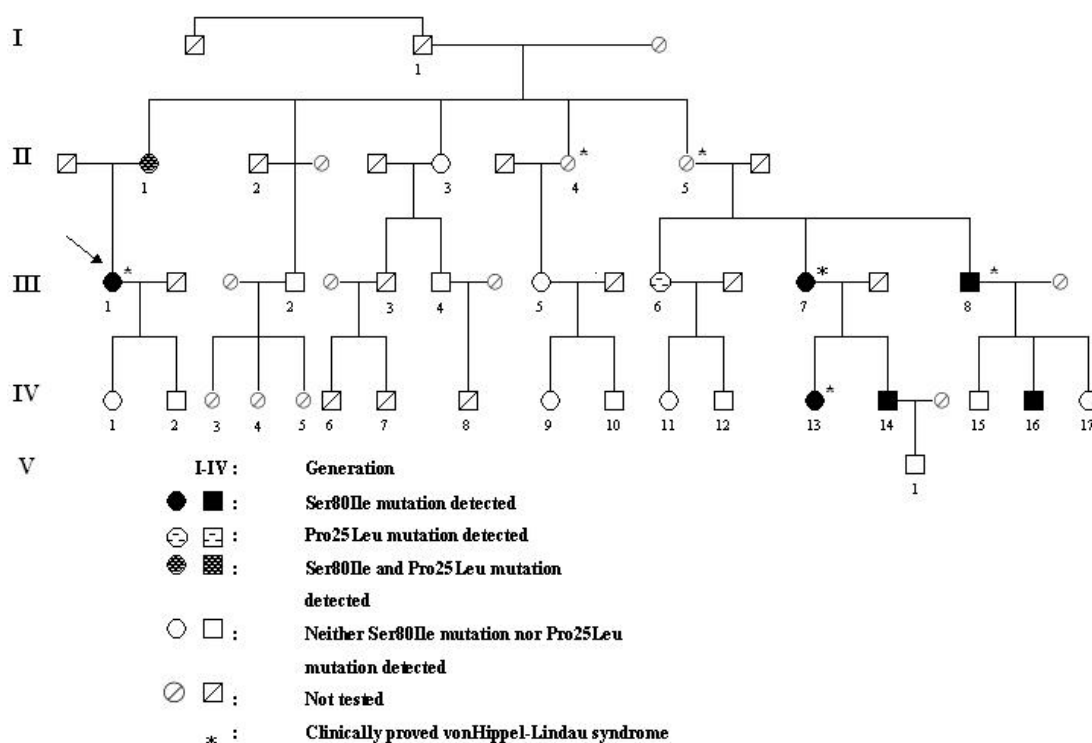
Az igazolt VHL mutációk funkcionális következményeinek tisztázásában az első lépés a mutációk okozta aminosavcserék beazonosítása a VHL fehérje szerkezetében. Ahogyan a **15. ábrán** látszik az S80-as kodon – az S68, S72 és S65 aminosavakkal együtt – olyan fontos foszforilációs hely, ami a glikogén-szintáz-kináz 3 (GSK3) szubsztrátja a pVHL30 fehérjében [455]. A GSK3 több olyan jelátviteli útvonal alkotóeleme, amelyek több szolid daganatban is károsodhat. Másik fontos összefüggés, hogy ezek a szerin aminosavak szerepet játszanak a mikrotubulus dinamika megváltoztatásában is. Lolkema és munkatársai mutatták ki, hogy más, szintén a savas kémhatású, N-terminális végen található szerin aminosavak (S33, S38 és S43) foszforilációja a HIF1 α -független tumorsuppresszor hatáshoz vezet [456].

A látszólag sporadikus Phaeo-ban szenvedő betegekben igazolt VHL csírasejtes mutációk funkcionális következményei is megbecsülhetőek a fehérje szerkezetből. A β -domén első

aminosava az L63, melynek L63P mutációja esetén a leucin lánctörő prolinra cserélődik [457], míg az Y156 aminosav az α - és β -domén kritikus kapcsolódási pontjának bizonyult [72], így mindkét mutáció következtében kóros, megváltozott funkciójú fehérje jön létre.

V.1.3. A *VHL* gén Ser80Ile és a Pro25Leu variánsok patogenetikai szerepének tisztázása

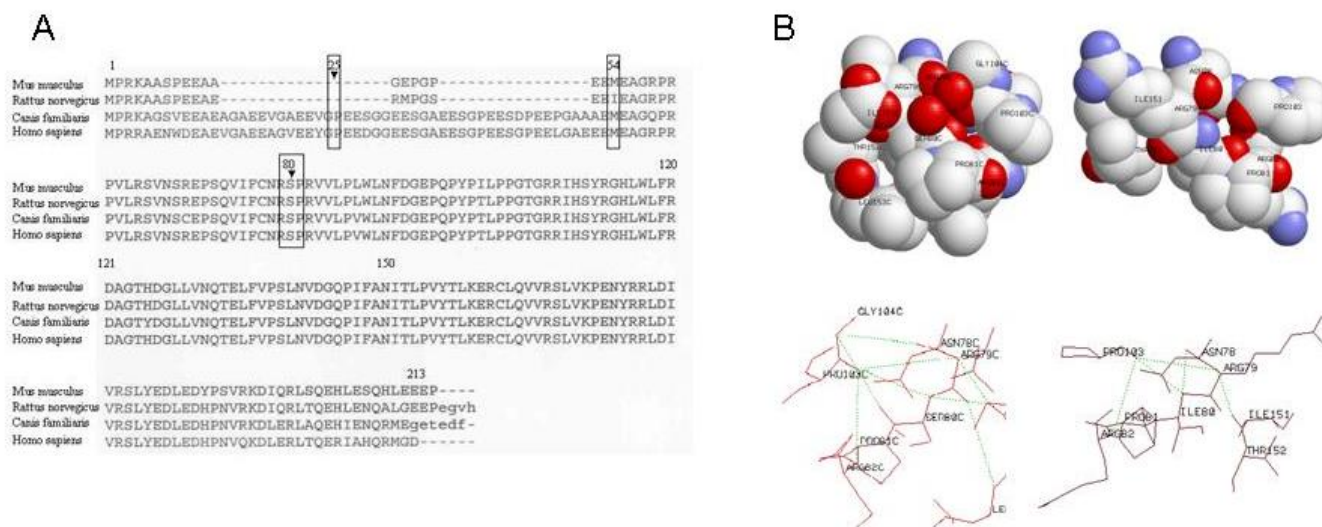
A VHL szindróma genetikai vizsgálata során látóterünkbe került egy több generációs család (16. ábra). A vizsgálatok az index betegben két aminosavcserével járó mindzsidáig nem ismertett génvariánst: AGT80AAT (p.Ser80Ile) c.239G>A, és a CCT25CTT (p.Pro25Leu) azonosított. A család 32 tagjának klinikai és genetikai vizsgálata bebizonyította, hogy ezek közül a Ser80Ile mutáció felelős a betegségért, míg a p.Pro25Leu variáns egy ártalmatlan génpolimorfizmus. A családfa, szekvenciaelemzés konzerváltságának vizsgálata és a vad és mutáns fehérjék 3D szerkezetének modellezése megerősítette eredményünket [458].



16. Ábra: A VHL gén Pro25Leu és Ser80Ile variánsokat hordozó család családfája. A sötéttel kiemelt betegek a Ser80Ile mutációt, az üres jelölővel ellátott tagok vad típusú gént, míg a vízszintes vonalazású családtagok a Pro25Leu polimorfizmust hordozzák. Egy tag (II/1.) mindkét eltérést hordozta [458].

A két *VHL* génvariáns patogenitásának megítélésben DNS szekvenciaillesztést és 3D molekulamodellézést is használtunk (17. Ábra). Ezek alapján látható, hogy a 80-as pozícióban található szerin konzervált, míg a 25-ös pozíció nem konzervált a különböző fajokban. Szintén

látható, hogy a 80-as pozícióban a szerin cseréje izoleucinná a molekula térszerkezetét átrendezi, ami a VHL funkciója szempontjából kritikus lehet.

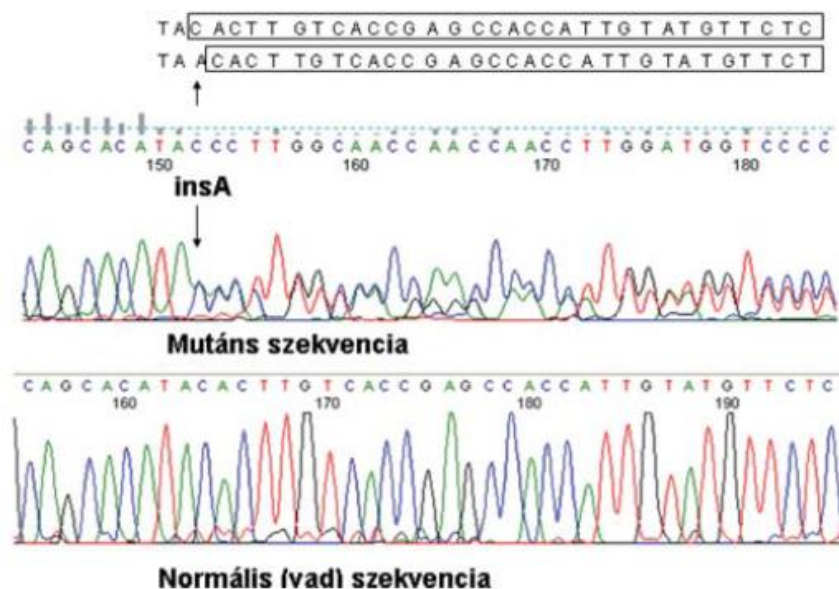


17. Ábra: a VHL Pro25Leu és Ser80Ile variánsok konzerváltságának analízise és a Ser80 és Ile80-as variánsok 3D-s modellje

A családfa, a konzerváltság és a molekula térszerkezet alapján kijelenthető, hogy ebben a családban a Ser80Ile variáns volt felelős a betegség kialakulásáért, míg a Pro25Leu egy ártalmatlan génvariáns.

V.1.4. A szukcinát dehidrogenáz enzim (SDH) alegységeit kódoló gének (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*: *SDHx* gének), *MAX* és a *TMEM127* mutációk prevalenciája hazai betegekben

A Phaeo/PGL genetikai szempontból az egyik legheterogénebb kórkép, eddig 15 gén mutációit igazolták háttérben. Munkám során először 2009-ben sikerült kimutatnunk egy fiatal férfi betegben az *SDHD* génben egy kereteltolódással járó patogén mutációt (**18. Ábra**) [459].



18. Ábra: Az *SDHD* gén c.147–148 insA kereteltolódást okozó mutáció kromatogramja a vad (normális) szekvenciához viszonyítva

Betegünk egy 33 éves aktívan sportoló fiatal férfi volt, akinek a vezető klinikai tünetei a verejtékezés és palpítáció voltak. Magas vérnyomás (szisztolés: 120–167 Hgmm, diasztolés: 87–110 Hgmm, amely 5 perces kerékpározás után 251/117 Hgmm-re emelkedett) szintén igazolható volt. A laboratóriumi rutinvizsgálatok enyhe hipokalémiát (szérum kálium 3,5mmol/l), enyhe hipokalcémiát (szérum kalcium 2,16mmol/l) mutattak, de a vérkép, vörösvérsejt-süllyedés, vércukor-, szérum kreatinin-, húgysav-, koleszterin-, triglicerid- és májfunkciós értékek normálisak voltak. A panaszok Phaeo gyanúját vetették fel, ezért 24 órán keresztül gyűjtött vizeletben katekolaminmetabolit-meghatározást végeztünk, ami emelkedett vanillin-mandulasav (VMA, 18,2 mg/24 óra, referenciatartomány: 1,8–6,7 mg/24 óra) és normetanephrin-ürítést (2812,9 µg/24 óra, referenciatartomány: 105–354 µg/24 óra), de normális metanephrin-ürítést (101,3 µg/24 óra, referenciatartomány: 74–297 µg/24 óra) igazolt. A mellékvese képalkotó vizsgálatok nem mutattak kóros eltérést. A Phaeo és neuroendokrin daganatok kimutatására kifejlesztett 8-fluoro-DOPA pozitronemissziós tomografiás vizsgálatot (18-F-DOPA PET-CT) külföldi intézetben végezték el; a vizsgálat az aorta hasi szakasza előtt a lumbalis III. csigolya magasságában körjelző izotópdúsulást mutatott. A 18-F-DOPA PET vizsgálatot jelzett daganatot később MR-vizsgálattal is azonosítani lehetett. Gyógyszeres előkezelést (alfa- és beta-adrenerg receptorblokkoló) követően az aorta bifurkációja előtt levő 3,5 cm-es daganatot laparoszópos műtettel eltávolították. A szövettani lelet PGL-t igazolt. A műtét után a beteg panaszai megszűntek, vérnyomása normalizálódott.

Az első esetünket követően az elkövetkező 10 évben tovább vizsgálva a hazai Phaeo/PGL-s betegeket 2016-ban összesen 82 látszólag sporadikus (a MEN2, NF1 és VHL szindrómák kizárására kerültek) Phaeo/PGL-ában szenvedő betegben végeztük el az *SDHx*, *MAX* és *TMEM127* gének

vizsgálatát. 11 esetben igazoltunk mutációt, amelyek közül 4 *SDHB* (*SDHB*: c.586 T > G; p.Cys196Gly, *SDHB*: c.586 T > C, p.Cys196Arg; *SDHB*: c.607G > T, p.Gly203Stop; *SDHB*: c.728G > A, p.Cys243Tyr) és 1 *TMEM127* (*TMEM127*: c.464 T > A, p.Leu155Stop) mutáció az irodalomban eddig nem ismert, új mutáció volt (**27. táblázat**) [460].

27. Táblázat: Látszólag sporadikus Phaeo/PGL-ban szenvedő betegekben kimutatott betegség-okozó génmutációk

Eset	Életkor	Manifesztáció	Gén/Mutáció
1	35	Phaeochromocytoma (recidiváló)	RET: Cys634Trp
2	45	Phaeochromocytoma (bilateralis)	RET: Cys611Tyr
3	31	Phaeochromocytoma, később medulláris pajzsmirigy carcinoma	RET: Cys634Trp
4	23	Phaeochromocytoma (bilateralis)	RET: Cys634Tyr
5	13	Phaeochromocytoma (malignus, bilateralis)	VHL: Arg79Gly *
6	55	Phaeochromocytoma	VHL: Tyr156Cys
7	25	Phaeochromocytoma	VHL: Arg167Gln
8	50	Phaeochromocytoma	VHL: Leu63Pro
9	31	Phaeochromocytoma	NF1**
10	31	Phaeochromocytoma	NF1**
11	33	Paraganglioma (intrabdominalis + fej-nyak) malignus	SDHB:Cys253Tyr
12	32	Paraganglioma (intrabdominalis + fej-nyak) malignus	SDHB: Cys196Gly *
13	31	Paraganglioma (intrabdominalis + fej-nyak)	SDHB: c.586T>C Cys196Arg*
14	30	Paraganglioma (intraabdominalis) multiplex, malignus	SDHB: Cys243Tyr*
15	19	Phaeochromocytoma + világossejtes veserák	SDHB: Gly203Stop*
16	37	Paraganglioma (fej-nyak)	SDHB: c286+1G/A,
17	24	Paraganglioma (intraabdominalis)	SDHB: Arg217Cys
18	62	Paraganglioma (fej-nyak)	SDHC: ivs+1G/T
19	56	Paraganglioma (fej-nyak)	SDHC: ivs+1G/T
20	32	Paraganglioma (intrabdominalis + fej-nyak)	SDHD: c.147-148 insA
21	51	Phaeochromocytoma (bilateralis) Paraganglioma (intraabdominalis + fej-nyak)	TMEM127: Leu155Stop*
22	22	Phaeochromocytoma egyoldali	TMEM127: Cys140Tyr
23	47	Phaeochromocytoma bilateralis	TMEM127: c572delC

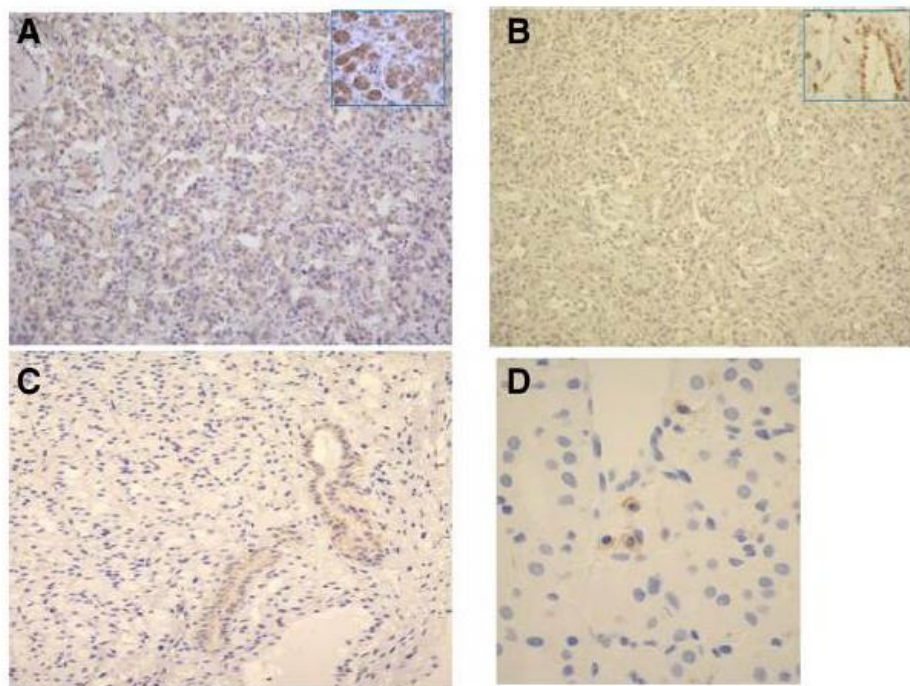
* munkacsoportunk által felfedezett új mutációk

A mutációk klinikai összefüggései közül kiemelendő, hogy a rendkívül rosszindulatú, multiplex metasztázisokkal járó daganatos kép az *SDHB* mutációkkal társult, ami megfelel az irodalmi adatoknak [461].

Egy betegünkben a PGL mellett világossejtes veserák is kialakult szintén egy új *SDHB* mutációhoz asszociálva. Az új mutációk patogenitásának egyik bizonyítéka, ha a daganatokban kimutatható az *SDHB* fehérje hiánya, ami megerősíti a Knudson féle tumorigenézis modellt. Ahogyan a **19. ábrán** is látható ez mindegyik PGL és a világossejtes veserák esetén teljesült. Az *SDHB* immunfestődés hiánya bizonyítja az *SDHB* mutációk patogenetikai szerepét, így ez az új

klinikai manifesztáció egy új fenotípus, amelyre az *SDHB* mutációt hordozó betegek klinikai nyomomonkövetésében figyelembe kell venni.

Eredményeinket későbbi, nagy esetszámú multicentrikus tanulmány is megerősítette [461].



19. ábra: Az új *SDHB* mutációkkal társult daganatok *SDHB* immunhisztokémia festődése. A PGL –ban és az onkocitás világossejtes veserákban hiányzik az *SDHB* festődés (A panel az *SDHB*: c.586 T > G (Cys196Gly) mutációhoz társult intraabdominalis PGL, pozitív kontroll mellékvesekéreg sejtek; B panel: az *SDHB*: c.728G > A (Cys243Tyr) mutációhoz társult PGL, pozitív kontroll endothél sejt; C és D panelek az *SDHB*: c.607G > T (Gly203Stop) mutációhoz társult világossejtes veserák; D: nem daganatos vesetubulusok pozitív *SDHB* jelölést mutatnak.

Eredményeim arra utalnak, hogy Magyarországon nincs ún. alapító mutáció a Phaeo/PGL-k hátterében, ezért mind a 15 gén mutációvizsgálata indokolt ebben a körképben.

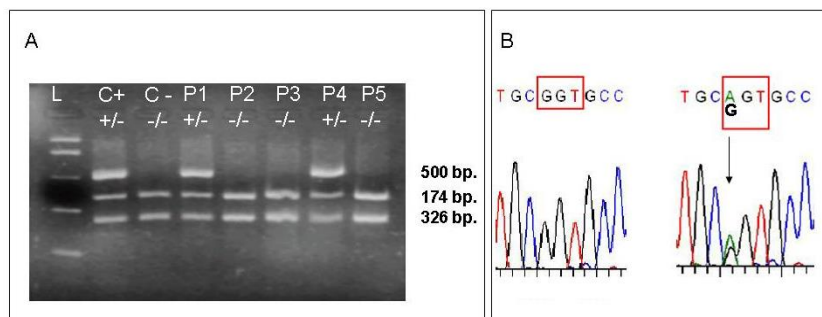
V.1.5. Az *SDHx* gének aminosavcserével járó génvariánsok fenotípust módosító szerepének tisztázása MEN2-s betegekben

A *SDHx* gének egyértelmű betegség-oka szerepe a Phaeo/PGL kialakulásában merült fel. Ugyanakkor számos olyan *SDHx* génvariáns is beazonosítottak, amelyeknek funkcionális hatásai vannak (pl. a kóros enzimműködés miatt fokozott reaktív oxigéngyök termelődés, felhalmozódó szukcinát miatt a hypoxia jelátviteli út aktiválódása, illetve kóros mitokondrium funkció), ami felvetette, hogy ezeknek a variánsoknak esetleg fenotípus módosító hatása lehet több endokrin tumorszindrómában is.

Ezek közül a MEN2 egy ígéretes csoport, hiszen a Phaeo a MEN2 egyik részjelensége, és a penetranciája még családon belül is nagymértékben eltérő. Munkánk során 77 csírasejtes *RET*

mutációt hordozó MEN2 szindrómás (55 MEN2A), 48 sporadikus MTC, 48 sporadikus Phaeo beteg és 100 egészséges egyén vizsgálatát végeztük el az *SDHB* és *SDHD* génvariánsok kimutatására.

Kezdetben az adatbázisunkban szereplő Phaeo-s betegek adatait elemeztük újra és felmértük, hogy az *SDHB* és *SDHD* gének közül mely eltérések fordultak elő beteganyagunkban. Egyedül az *SDHD* p.G12S variánst mutattuk ki sporadikus Phaeo betegeinkben. Ezért a továbbiakban erre az eltérésre fókuszáltunk. Beállítottunk egy restrikciós enzimemésztési módszert, amellyel költséghatékony módon tudtuk elvégezni a genotipizálást az összes MEN2 szindrómában szenvedő beteg esetén (**20 ábra**).



20. Ábra: Az *SDHD* gén G12S polimorfizmus vizsgálata. A panel: restrikciós enzimemésztés, L: DNS marker, C+: pozitív kontroll; C-/-: negatív kontroll (vad típus); +/-: heterozigócia, P1-P5: probandok; bp: bázispár. Panel B: a variáns normális (vad) szekvencia kromatogramja, valamint egy heterozigóta eltérés.

Az elvégzett vizsgálatok az *SDHD* p.G12S variánsa szignifikáns dúsulását igazolták MEN2As betegeknél (8/55) míg sporadikus MTC, sporadikus Phaeo betegeknél nem tudtuk ezt a variánst igazolni.

28. Táblázat: Az *SDHD* G12S polimorfizmus összefüggései MEN2A szindrómában

MEN2A (n=55)	G12S negatív	G12S pozitív
Probandok (n=16)	n=13	n=3
Életkor (évek ± szórás)	40.1 ± 9	43 ± 3
Gyakoriság		
MTC	12/13	3/3
Phaeo	6/13	2/3
HPT	4/13	1/3
Szérum kalcitonin átlag ± SD (tartomány)	1206 ± 932 (13-2400)	6864 ± 11111 (124-19690)
Családtagok (n=39)	n=34	n=5
Életkor (évek ± szórás)	32.5 ± 19.3	29.6 ± 20.5

Gyakoriság		
MTC	22/34	3/5
Phaeo	8/34	2/5
HPT	4/34	1/5
Szérum calcitonin átlag ± SD (tartomány)	393.8 ± 556 (0-1978)	436.2 ± 876 (0-2000)

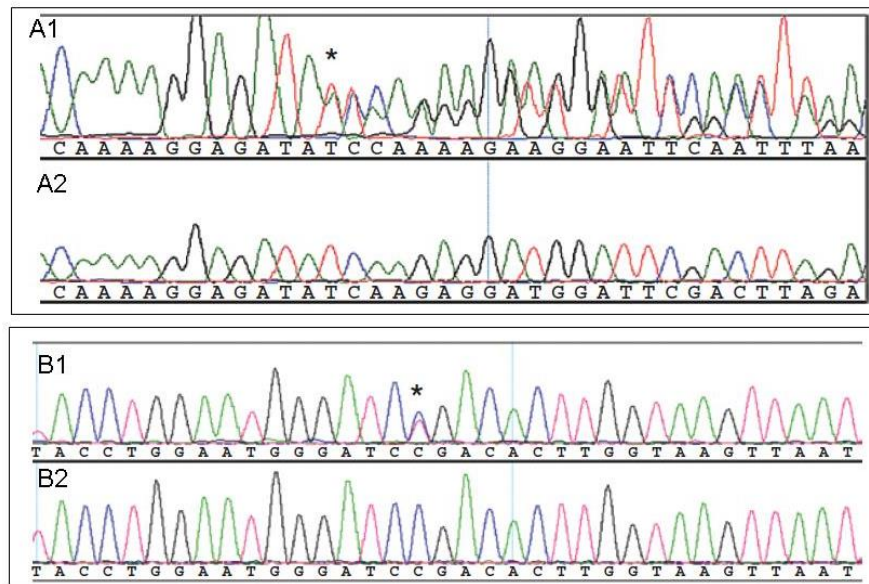
*MTC: medulláris pajzsmirigy karcinóma, Phaeo: phaeochromocytóma, HPT: hiperparatireózis, MEN2: Multiplex Endokrin Neoplázia 2-es típus

Az egészséges kontrollok közül 1 esetben találtuk meg a p.G12S variánst. A manifesztációk megjelenése idején az életkor, a szérum calcitonin szintek nem mutattak összefüggést a variánssal. (28. táblázat). Eredményeink illeszkednek azokhoz az irodalmi adatokhoz, amelyek kimutatták, hogy a H50R variánsa az *SDHD* génből gyakoribb volt sporadikus és familiáris MTC-ben [462,463]. Ugyanakkor az *SDHx* gén variánsokkal igazolt eltérések nem voltak kimutathatóak brit betegekben, ami felhívja a figyelmet a populációk közötti eltérésekre [464].

Összesítve ezeket az eredményeket megállapíthatjuk, hogy, még egy jól ismert monogénes szindróma esetében is lehetnek olyan génvariások, amelyek az adott fenotípus módosításában vehetnek részt. Ez a megfigyelés indokolttá teheti az adott szindrómában előforduló manifesztációkhoz kapcsolódó biztosan betegség-okaóó gének vizsgálatát is [465].

V.1.6. Együttesen előforduló *SDHC* és *PTEN* mutációkkal társult klinikai fenotípus

Az Amerikai Egyesült Államokban folytatott kutatómunkám során a Cowden betegség genetikai vizsgálatával is foglalkoztam. Az örökletes daganatszindrómákhoz szorosan kapcsolódik ez az eset ismertetése, ami szintén megerősíti, azt, hogy még az extrém ritkának tűnő szindrómák is társulhatnak egymással és egy beteg akár két örökletes kórképben is szenvedhet. A 43 éves nőbetegben 37 éves korában follikuláris pajzsmirigyrákot, és egy éven belül a bal, majd két év múlva a jobb oldali carotis testet érintő PGL-át diagnosztizáltak. Mindegyik daganatot sikeresen eltávolították, egyéb malignus kórkép nem volt kimutatható. Ugyanakkor az anamnézis során kiderült, hogy méh leiomyomája és fibrocisztás emlődiszplázia miatt is állt már korábban kivizsgálás alatt. Ezek az eltérések makrokefáliával és papillomatózus papulákkal felvetették a Cowden szindróma klinikai diagnózisát. A genetikai vizsgálat patogén *PTEN* és *SDHC* mutációkat igazolt (21. ábra). Esetünk az első dokumentált beteg, akiben az *SDHC* mutáció mellett egyéb, dominánsan öröklődő tumorszindróma is kialakult [466].



21. ábra: Csírasejtes *PTEN* és *SDHC* mutációk kromatogramjai. Adenin inszerció a *PTEN* gén 48. pozícióban, ami kereteltolódást okoz, egy korai Stop kodonnal a 16. kodonban (A1 panel, az A2 panel a megfelelő vad típusú szekvenciát mutatja). A B1 panel az *SDHC* c397T>C ((Arg133Stop) mutáció elektroferogramja, míg a B2 panel a megfelelő szakasz vad típusú szekvenciája.

A két örökletes génhibának a betegben és a családjában is fontos következményei vannak, specifikus diagnosztikai eljárások, tumor surveillance és természetesen genetikai tanácsadást tesz szükségessé [81,89]. A Cowden szindrómához kapcsolódó klinikai ajánlás tartalmazza az emlőrák (évente mammográfia, MRI), endometrium karcinóma (endometrium vizsgálata ultrahang vizsgálattal, vagy endometrium biopszia végzését) és az egyéb daganatok irányába történő vizsgálatokat (pajzsmirigy karcinóma irányába klinikai és laboratóriumi vizsgálatokat, bőrgyógyászati konzultációkat). Az *SDHx* mutációkhoz kapcsolódó szűrővizsgálatok a nyak, mellkas, has és medence képalkotó vizsgálatokkal történő vizsgálata 1-2 évente, valamint vizelet metanefrin és katekolaminok meghatározását javasolja. A 18-fluorodopamin PET vizsgálat klinikai jelentőségét több tanulmány is kiemeli, elsősorban a fej-nyak régió képalkotó diagnosztikájában magasabb érzékenységet igazolták az MRI-vel összehasonlítva [81].

V.1.7. A csírasejtes *SDHx* variánsok hatása Cowden (CS) és Cowden-szerű szindrómában szenvedő betegekben

Szintén az USA-ban végzett és a hazai kutatómunkámhoz is szorosan kapcsolódó vizsgálat volt a Cowden kórban (CS) és Cowden szindrómához hasonló (CS-szerű) betegségben szenvedők szűrése *SDHx* mutációkra. Összesen 375 *PTEN* mutáció negatív CS/CS-szerű szindrómás beteg, analízisét végeztük el. A 375 *PTEN* negatív eset közül 74 esetben igazoltunk mitokondrium diszfunkciót, az emelkedett MnSOD expresszióval. Ezek közül 10 (13.5%) esetben csírasejtes

SDHB és *SDHD* génvariánst mutattunk ki (29. táblázat). A *PTEN* mutációt hordozó CS/CS-szerű betegekhez képest az *SDHx* génvariánsokat hordozók között gyakoribb volt az emlőrák, a pajzsmirigyrák és a veserák előfordulása. Számszerűsítve az eredményeket a világossejtes veserák a 10 *SDHx* variánst mutató CS-szerű betegben 2 esetben míg a 230 *PTEN* mutációt hordozó beteg közül csak 4 esetben volt jelen ($p=0.03$), a pajzsmirigy karcinóma 5 a 10-ből versus 15 a 206 ($p<0.001$) betegben volt jelen. Szövetanilag az 5 *SDHx* variánsokhoz társult pajzsmirigy daganat papilláris karcinóma volt, míg a *PTEN* mutációkhoz asszociált daganatokban csak 1 esetben volt ez a hisztológia. Emlő daganatot a 9 *SDH* érintett nőből 6 esetben, míg *PTEN* mutációt hordozók 28%-ában volt jelen ($p<0.001$).

Eredményeink megerősítik az *SDHx* génvariánsok hajlamosító szerepét különböző szolid tumorok kialakulására.

29. Táblázat: *PTEN* mutáció negatív, de *SDHx* gén variánsokat hordozó betegek genotípus-fenotípus összefüggései.

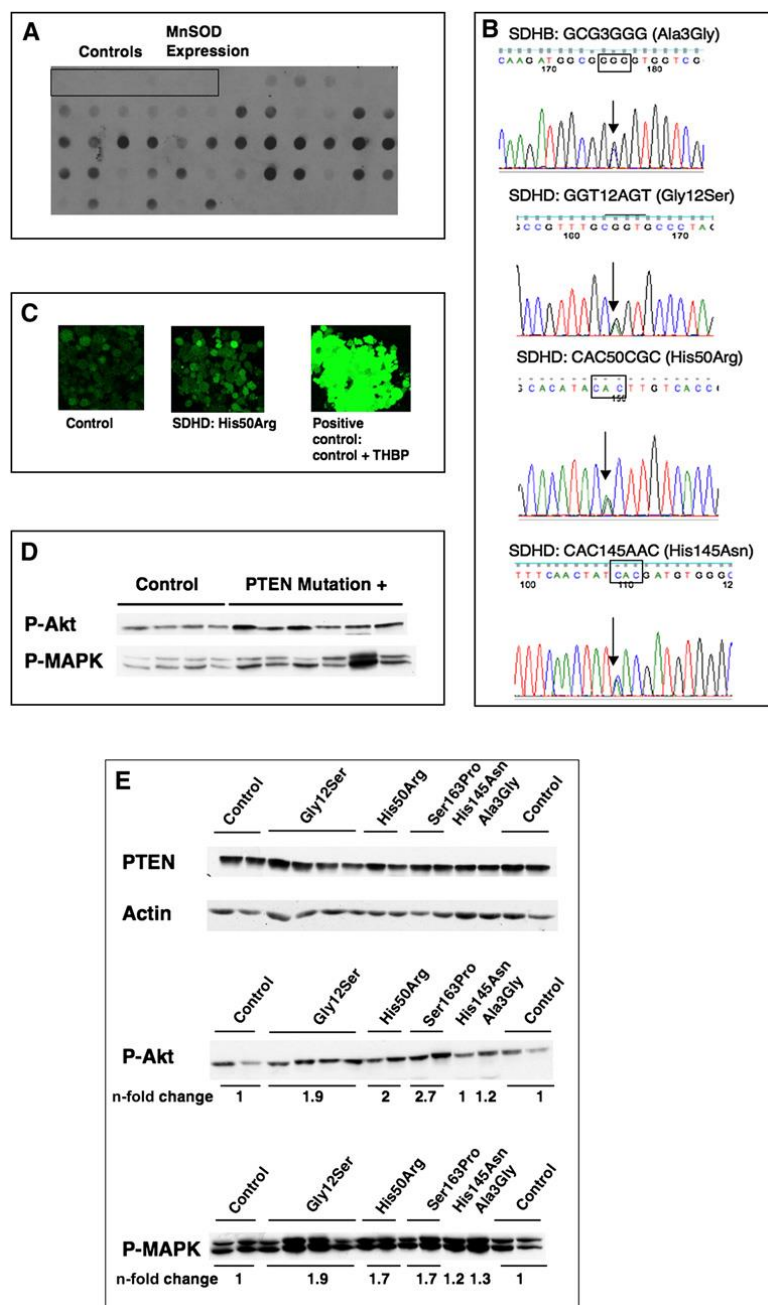
Gén/Variáns			Daganatos manifesztációk az érintett szövetekben				
Életkor/Nem	Gén	Mutáció	Emlő	Pajzsmirigy	Vese	Méh	Családi halmozódás
41F	<i>SDHB</i>	Ala3Gly	C			L	endometrium cc.
29F	<i>SDHB</i>	Ser163Pro		C		B	emlőrák, PTC
54F	<i>SDHB</i>	Ser163Pro		C		B	emlőrák, PTC
69F	<i>SDHD</i>	Gly12Ser	C			C	emlőrák, endometrium cc.
62F	<i>SDHD</i>	Gly12Ser	B	B	C	L	nincs
46F	<i>SDHD</i>	Gly12Ser	C	C		L	nincs
42F	<i>SDHD</i>	Gly12Ser	C			L	nincs
56F	<i>SDHD</i>	His50Arg	C	C			emlőrák
55M	<i>SDHD</i>	His50Arg	C				emlőrák, PTC
53F	<i>SDHD</i>	His145Asn	C	B		C	nincs

Rövidítések: CC, karcinóma; B, szövettanilag benignus; L, méh leiomyoma; PTC, családi halmozódású papilláris pajzsmirigy karcinóma.

A beazonosított *SDHx* variánsok patogenezisének igazolásához komplex biokémia elemzéseket végeztünk. A variánsok gyakoriságairól származó adatok, amelyek a különböző genetikai adatbázisokban fellelhetőek megerősítette patogén jellegüket, hiszen az *SDHD* His145Asn variáns egyik adatbázisban sem, valamint a saját kontrolljainkban sem fordult elő. A 145-ös pozícióban lévő hisztidin az egér, juh és szarvasmarha genomjában is egy konzervált pozíció, ami szintén alátámasztja funkcionális jelentőségét. A többi kimutatott variánst sem tudtuk kimutatni az egészséges kontroll populációban, valamint a közölt allélgyakorisági adatok, amelyek még a leggyakoribb variánsok esetén (*SDHB* Ser163Pro és *SDHD* Gly12Ser) sem érte el a 3%-ot megerősíti patogeneziséket [467–469].

A beazonosított ritka variánsokhoz kapcsolódó mechanizmusok tisztázása rendkívüli jelentőségű ezért komplex *in vitro* funkcionális vizsgálatokat végeztünk a variánsokat hordozó betegekből izolált primér limfoblasztok felhasználásával.

Az SDH funkció következménye a mitokondrium diszfunkció, amelyet fokozott reaktív oxigén gyökök (ROS) képződésével és a MnSOD enzim expressziójával lehet mérni [470,471]. Munkánk során a ROS termelődés mértékét a carboxy-H2DCFDA jelölés intenzitásának mérésével végeztük el konfokális mikroszkópia segítségével, valamint a mitokondriumban expresszálandó enzim - a MnSOD - expressziójának mérésével dot-blot technikával. Ennek során az *SDHB* Ser163Pro, *SDHD* Gly12Ser, és His50Arg variánsok esetében igazolódott a fokozott ROS képződés a kontrollhoz viszonyítva (**22. ábra és 30. táblázat**). Az *SDHB* Ala3Gly és az *SDHD* His145Asn variánsok nem eredményeztek fokozott ROS termelést és szintén ezek az eltérések nem okozták a P-AKT aktivitás emelkedést, de a P-MAPK jelátviteli út aktivitás növekedése kimutatható volt. A PTEN tumor szuppresszor funkcióját az antiapoptotikus és proliferációt serkentő AKT (protein-kináz B) és a mitogen-aktivált kináz (MAPK) gátlásán keresztül látja el [472,473]. A fokozott szabadgyök képződés eredményeként számos fehérje és lipid károsodhat, amelyek funkcióvesztése összefügg a tumorigenézissel. Ezek közé tartozik a PTEN tumorszuppresszor hatású fehérje is [474]. A PTEN enzim aktív centrumában elhelyezkedő két cisztein között diszulfid híd jön létre, ami az enzimaktivitás elvesztését eredményezi [475]. Így a saját eredményeink megerősítik azt a hipotézist, hogy az *SDHB* Ser163Pro, az *SDHD* Gly12Ser és az *SDHD* His50Arg variánsok mindegyik tesztelt jelátviteli út (emelkedett ROS, P-AKT és P-MAPK) fokozott aktiválódását okozta. Ezek alapján Cowden betegségben vagy multiplex daganatokkal diagnosztizált betegeknél a *PTEN* gén mellett az *SDHx* gének vizsgálata is javasolt [476].

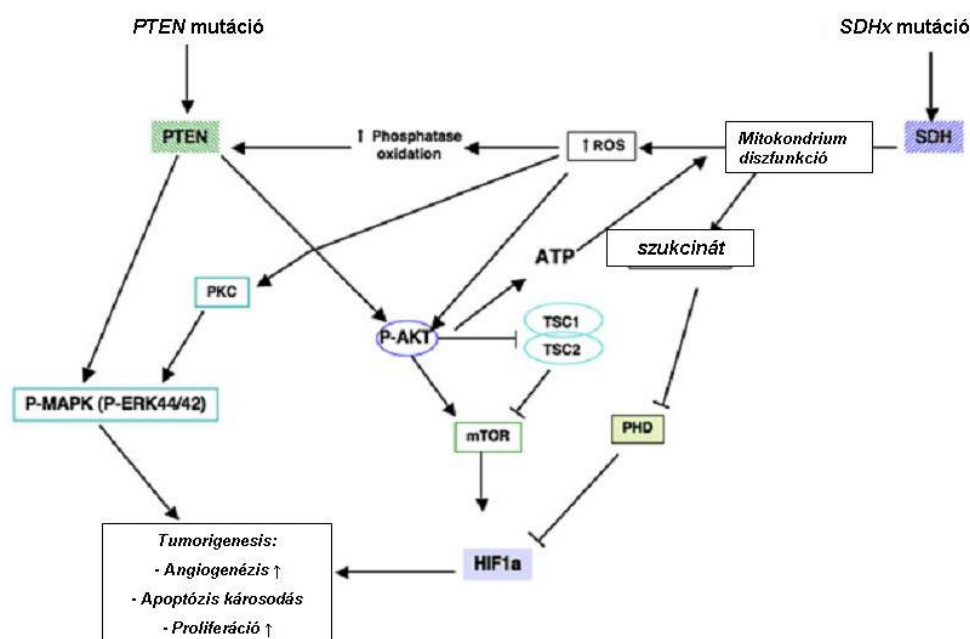


22. Ábra: A PTEN-mutáció negatív CS és CS-szerű szindrómában szenvedő betegek genetikai és biokémiai tulajdonságai. A panel: a MnSOD expressziója dot blot technikával. A bekeretezett minták a kontroll, alacsony MnSOD expressziót mutató minták. B panel: a beazonosított *SDHx* variánsok elektroferogramjai, hasonlóan a Phaeo/PGL betegekben beazonosított *SDHx* variánsokhoz ezek az eltérések is heterozigóta formában voltak kimutathatóak. C Panel: emelkedett ROS jelölés egy csírasejtes *SDHD* His50Arg mutációt hordozó beteg limfoblastjában. A ROS expressziót a carboxy-H2DCFDA jelöléssel mértük. Pozitív kontroll egy kontroll egyénből származó minta 90 percig történő tert-butyl hydroperoxid-os kezeléssel indukált ROS expressziót mutatja (jobb oldali kép). D panel: a P-AKT és P-MAPK (P-ERK44/ 42) expresszió csírasejtes PTEN mutációt hordozó betegek limfoblasztjaiban. Különböző *PTEN* mutációkhoz eltérő P-AKT és P-MAPK expresszió társul. E panel: a PTEN, P-AKT és P-MAPK fehérje expresszió az *SDHx* variánsokat hordozó betegekből származó primér limfoblasztokban. A fehérje expresszió aktinhoz normalizáltuk. Minden beteg esetében először a P-AKT-t és P-MAPK-t normalizáltuk az aktinhoz, majd ezeket az arányokat hasonlítottuk össze a betegek és kontroll minták között. Megegyező arány esetén az érték 1.

30. Táblázat: A reaktív oxigén gyökök (ROS), a MnSOD és a P-AKT és P-MAPK expresszió mérése SDHx variánsokat hordozó CS-szerű betegekben. Az expresszió-változás a kontroll-egyénekhez viszonyított aktinra normalizált denzitometriás mérések átlagát jelenti. (A P-AKT/aktin és P-MAPK/aktin denzitások a betegek és kontrollok között)

Mutáció/Variáns	MnSOD	ROS	P-AKT expresszió változás	P-MAPK expresszió változás
SDHB Ala3Gly	emelkedett	normalis	1.2	1.3
SDHB Ser163Pro	emelkedett	emelkedett	2.7	1.7
SDHD Gly12Ser	emelkedett	emelkedett	1.9	1.9
SDHD His50Arg	emelkedett	emelkedett	2.0	1.7
SDHD His145Asn	emelkedett	normalis	1.0	1.2

Eredményeinket összegezve sikerült *SDHx* génvariánsokat igazolnunk, olyan Cowden szindrómában vagy Cowden szindróma klinikai képét utánzó betegekben, akikben *PTEN* mutáció nem volt kimutatható. A betegekben kimutatott daganatok aláhúzzák az SDH enzim szerepét a tumorigenézisben. Az enzimkárosodás mértéke a különböző ritka aminosavcserék hatására is a sejttúlélés és szabadgyök képződés fokozódását eredményezi. A reaktív oxigén gyökök felszaporodása pedig egyéb fehérjéken, pl. *PTEN* keresztül akár a sejtproliferáció és antiapoptotikus utak aktivációját okozza (23. ábra).



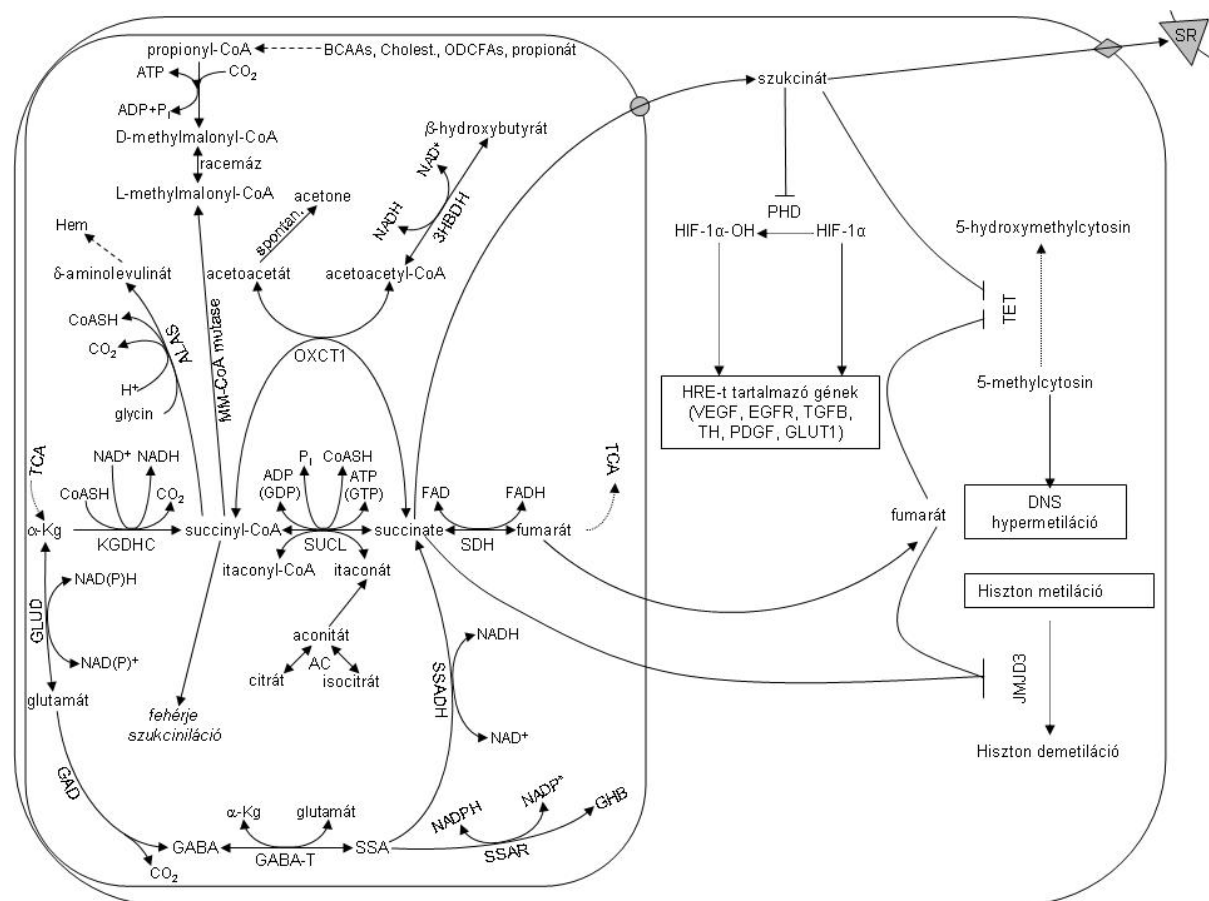
23. Ábra: a *PTEN* és az *SDHx* mutációkhoz társuló közös pathomechanizmus sematikus ábrája

V.1.8. A szukcinát hatásainak összegzése a tumorigenézisben

Mindezek a korábbi genetikai eredmények felvetik, hogy az SDH enzim csökkent működése központi szerepet játszhat a tumorigenézisben. Régóta ismert a daganatos sejteknek az a tulajdonsága, hogy alkalmazkodni képesek a megváltozott tápanyagellátáshoz vagy a szöveti hipoxiához is. Ezek a megfigyelések utalnak arra, hogy közvetlen kapcsolat lehet a metabolikus

utak és a daganatos sejtek túlélése között. Mivel az SDH enzim a tudományos munkám egyik fontos vizsgálati célpontja volt és a korábbi, betegekből származó eredmények is igazolták szerepét a daganatképződésben további kapcsolódási pontokat kerestünk a pathomechanizmus pontosításáért. Ennek egyik lépése volt egy összefoglaló tanulmányt készítése a biokémiai hatásokról és a szukcinát felhalmozódás következtében kialakuló egyéb útvonalak aktivitásáról és ezek potenciális szerepéről a daganatképződésben.

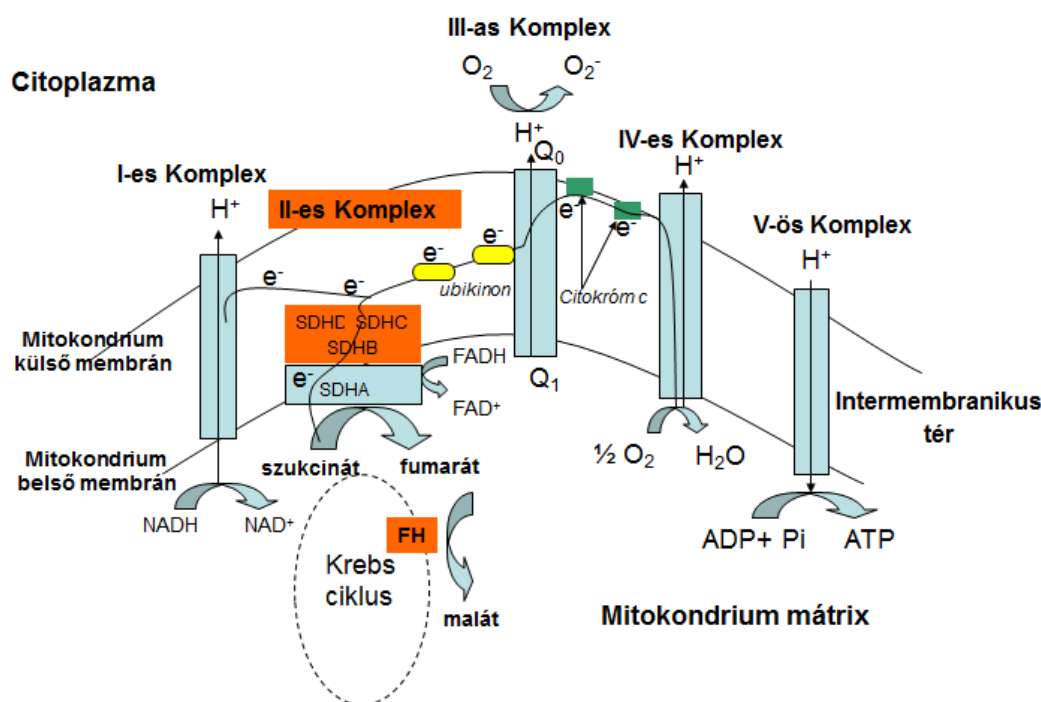
Ahogy az előző pontban bemutatott eredményeink is igazolták az *SDHx* mutáns betegekből egyidejűleg többféle sejttúlélési mechanizmus is aktiválódhat. Véleményem szerint ezek közül bármelyiknek szerepe lehet a Phaeo/PGL-k kialakulásában vagy a klinikai lefolyásában. A jelátviteli utak közötti összefonódások és azok dinamikája felelős lehet az egyéni különbségek és a különböző mutációkhoz társuló daganatok penetranciáért. Feltételezhetjük, hogy a Phaeo/PGL tumorok olyan sejtekből erednek, amelyek a fejlődés vagy differenciálódás során apoptózis révén elpusztulhattak volna, de a csökkent vagy kóros mitokondrium funkció miatt túléltek és rezisztensekké váltak a későbbi apoptotikus ingerek iránt. Jelenlegi kutatásaim célja az *SDHx* mutációkhoz társuló mechanizmusok feltárása, az *SDHB* mutációkkal társuló extrém malignus fenotípus okainak megismerése. Ebben a munkában az első lépés volt összegezni az SDH enzim aktivitás következményeit, feltérképezni azokat a biokémiai utakat, amelyek a kieső SDH enzim miatt biztosítják a sejtek túlélését.



24. Ábra: A szukcinát mint a metabolikus és jelátviteli utak központi szereplője. (rövidítésjegyzék)- ALAS: δ -aminolevulinát szintáz, PHD: prolyl hydroxyláz, TET: tíz-tizenegy transzlokációs család 5-metilcitosin hidroxiláz (ten-eleven translocation (TET) family of 5-methylcytosine (5mC) hydroxylases), JMJD3: Jumanji C domént tartalmazó hiszton lizin demetiláz, VEGF: vascular endothelial growth factor, EGFR: epidermal growth factor receptor, TGF β : transforming growth factor β , TH: tirozin hidroxiláz, PDGF: trombocita-derivált növekedési faktor (platelet-derived growth factor), GLUT1: glukóz transzporter 1, BCAAs: elágazó láncú aminosavak, ODFAs: páratlan számú láncot tartalmazó zsírsavak, Cholest: koleszterin, 3HBDH: 3-hidroxybutirát dehidrogenáz, KGDHC: ketoglutarát dehidrogenáz komplex, GLUD: glutamát dehidrogenáz, GAD: glutamát dekarboxiláz, GABA: γ -aminobutir sav, EC space: extracelluláris tér, GABA-T: GABA transzamináz, SSA: szukcinát szemialdehid, SSADH: szukcinát szemialdehid dehidrogenáz, SSAR: szukcinát szemialdehid reduktáz, GHB: γ -hidroxibutir sav, SDH: szukcinát dehidrogenáz; SCOT: szukcinil-CoA:3-ketosav koenzim A transzferáz, SR: szukcinát receptor.

A szukcinát dehidrogenáz enzim négy alegységből (SDHA, SDHB, SDHC és SDHD) áll, amelyek közül egyik sem a mitokondriális genomban kódolt. Mindegyik alegység mutációi genetikai rizikót jelentenek Phaeo és PGL-k kialakulására.

A SDH enzim az anyagcserében betöltött szerepe mellett részt vesz a mitokondriális elektronszállításban is. A **24. ábrán** is látható, hogy a szukcinát központi szerepet tölt be az anyagcserében, ahol a citromsav (Krebs ciklus) ciklusban a szukcinát-fumarát átalakulást végzi.

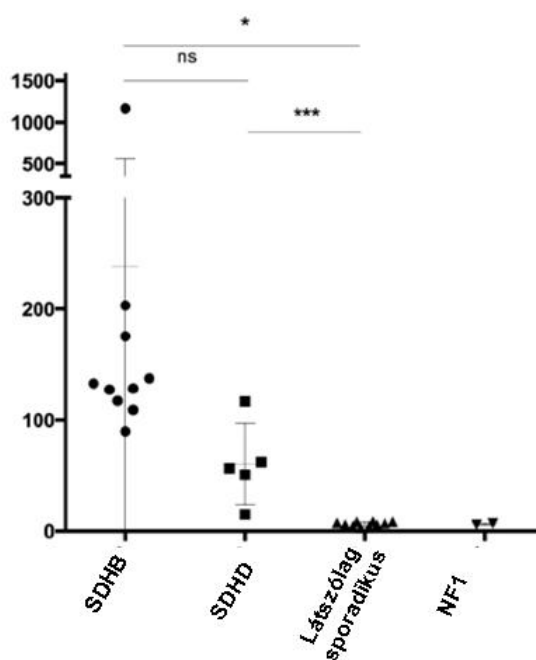


25. Ábra: A szukcinát dehidrogenáz szerepe a mitokondriális elektronszállításban.

Kutatási témám szempontjából az SDH károsodás miatt kialakuló legjelentősebb mechanizmusok, amelyek a hormonrendszer daganataihoz kapcsolódnak elsősorban a felhalmozódó szukcináthoz és a kóros elektrontranszportozhoz köthetők. Az SDH alegységek közül az SDHB alegységben számos Fe-S klusztter található, amelyek ebben a funkcióban nélkülözhetetlenek. Klinikai megfigyelés, hogy a legrosszindulatúbb daganatok az SDHB Fe-S klusztterben résztvevő aminosav mutációkhoz társulnak, így feltételezhetjük, hogy az elektron-szállító rendszer gátlásának lehet központi szerepe a malignus Phao/PGL-k kialakulásában. A különböző enzim komplexek különböző mértékű szabadgyök képződést okoznak. Legnagyobb mértékű ROS felszabadulás az I-es és III-as komplexek gátlása után jön létre. A II-es komplexről, mivel nem rendelkezik proton pumpa aktivitással nem gondolták, hogy hozzájárulhat a szabadgyök képződéshez, de Ishii és munkacsoportja gilisztában igazolta, hogy a *mev1* gén (ami emberben az *SDHC*-nek felel meg) misszensz mutációja fokozott szabadgyök képződéssel, és korai öregedéssel járt együtt [477], míg Slane és munkacsoportja ugyancsak *SDHC* mutációt hordozó sejtvonalak vizsgálatával kimutatta a fokozott szabadgyök képződést, az ehhez társult metabolikus oxidatív stresszt és a megnövekedett genom instabilitást [471]. A szabadgyök képződés helye nem egyértelmű, feltételezik, hogy reverz elektronáramlás jön létre, ami végül a FAD rendszeren keresztül juttatja vissza az elektronokat a mitokondrium mátrixba [478]. A fokozott szabadgyök képződés eredményeként számos fehérje és lipid károsodhat, amelyek funkcióvesztése összefügg a tumorgenézissel. Ezek közé tartozik a PTEN tumorszuppresszor hatású fehérje is [474]. A PTEN enzim aktív centrumában elhelyezkedő két

cisztein között diszulfid híd jön létre, ami az enzimaktivitás elvesztését eredményezi [475]. Ennek részletezését és klinikai következményeit a Cowden kórban igazolt *SDHx* variánsok funkcionális következményei részben ismertettem.

Az *SDHx* mutációkhoz társult Phaeo/PGL szövetekben kimutatható a felhalmozódó szukcinát mennyisége (26. Ábra), a legnagyobb mértékű felhalmozódást az *SDHB* mutációt hordozó daganatokban tapasztaltuk. Az elvégzett mérések felvetik azt a lehetőséget, hogy a szukcinát/fumarát arányt akár biokémiai markerként is lehetne használni a Phaeo/PGL-k diagnosztikájában, de mindenképpen alátámasztja azokat a megfigyeléseket, amelyek a felhalmozódó szukcinátot, mint onkometabolitkot emlegetik.



26. Ábra: A szukcinát/fumarát arány *SDHB*, *SDHD*, sporadikus és *NF1* mutációkhoz társult Phaeo/PGL-ákban [479].

Ezt a funkciót a szukcinát több enzimes család gátlásán keresztül végezheti. A legrégebben ismert ilyen enzim a prolil hidroxiláz, ami a HIF1 α lebontásában vesz részt, így a HIF1 α stabilizálódik és beindítja a HRE géneket (6. 23. és 24. ábrák) [83,480–482].

Ezen a mechanizmuson kívül a szukcinát gátolja a TET (tíz-tizenegy transzlokáns család 5-metilcitozin hidroxiláz és JMJD3 (Jumanji C domént tartalmazó hiszton lizin demetiláz) enzimeket is, amelyek szintén dioxigenázok csoportjába tartoznak és szerepük – a DNS és hiszton metiláci/demetiláció koordinálása- a daganatok kialakulásában egyre inkább előtérbe kerül.

A DNS metiláció a gének kikapcsolódását eredményezi, így a TET metilcitozin hidroxiláz gátlásával tulajdonképpen azoknál a géneknél, ahol aktivitás kellene bekövetkeznie, a szukcinát jelenlétében ez nem tud megtörténni, így a metilált gének továbbra is inaktívak maradnak. A JMJD3 a hiszton demetilációt végzi, ami szintén aktivitás nyerést jelentene, de ez a szukcinát jelenlétében

szintén károsodhat, így az adott sejt vagy folyamat szempontjából jelentős gének maradhatnak inaktívak. Mindezeknek a hatásoknak a tisztázása és jelentőségük felismerése a tumorbiológiában további kísérleteket igényelnek. Jelenlegi kutatómunkám ezeknek a mechanizmusoknak a megismerését is célozza.

V.1.9. A *MEN1* szindrómáért felelős *menin* mutációk beazonosítása és a *genotípus-fenotípus* összefüggések hazai betegekben

A *MEN1* szindróma molekuláris genetikai analízisét a SE II. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Genetika Laboratóriumában végeztük el, összesen 19 család 32 betegében. Ezekben az esetekben a klinikai diagnózis *MEN1* szindróma volt. Összesen 10, különböző *MEN1* génmutációt igazoltunk, amelyek közül 4 (A91V, G28A, E26X és az L301R) új mutáció volt (**30. táblázat**). A családi halmozódást mutató esetek mindegyikében (6/6) kimutattuk a betegséget okozó eltérést, míg a sporadikus megjelenésű *MEN1* szindrómában szenvedők mintegy 23%-ában (3/13). Eredményeink megerősítik, azokat az irodalmi adatokat, hogy a familiáris előfordulás bír a legnagyobb erővel arra vonatkozóan, hogy *MEN1* szindrómában igazolni lehessen a betegségért felelős génhibát.

30. táblázat: *MEN1* génmutációk és polimorfizmusok hazai betegekben

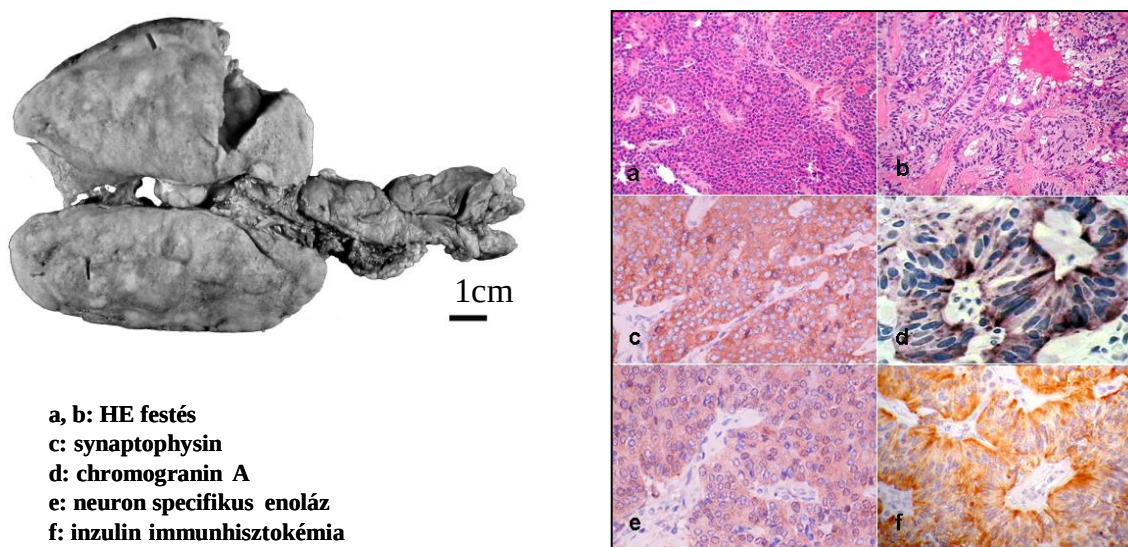
	Mutáció	Polimorfizmus
Exon 2	nt317ins5bp A91V G28A nt359del4bp E26X*	S145S
Exon 3	nt738del4bp Q209X	R171Q
Exon 5-6	L301R	-
Exon 8	C354X	-
Exon 9	-	D418D L432L
Exon 10	nt1657insC	-

A vastag betűkkel jelölt mutációkat a nemzetközi irodalomban korábban még nem szerepeltek.

Összesen 10 probandban találtunk betegség-okozó *MEN1* gén mutációt (2 esetben deléció, 2 esetben inzerció, 3 esetben nonsense és 3 esetben missense mutáció). A 10 mutáció közül 5 a nemzetközi irodalomban korábban még nem ismertetett, új mutációnak felelt meg. A mutációkon kívül nagyszámú ismert, betegséget nem okozó polimorfizmust is azonosítottunk [483].

Családvizsgálattal két esetben igazoltuk, hogy a betegség- okozó *MEN1* gén mutáció *de novo* alakult ki; további két esetben az egyik szülő korai halála miatt nem sikerült a mutáció eredetét, esetleges *de novo* voltát megállapítani.

Az első hazai eset, akiben igazoltuk a *MEN1* mutációt egy atípusos *MEN1* szindrómás beteg volt [484]. A fiatal nő 25 éves korában a betegség első tünete egy nagyméretű (11 cm-es), multiplex nem funkcionáló hasnyálmirigy neuroendokrin daganat volt, melyet distális pancreatectomiával távolítottak el (27. ábra). A műtét során egy 3 cm-es hasfali lipoma is eltávolításra került.



27. ábra: *MEN1* szindrómás beteg hasnyálmirigy neuroendokrin tumorának makroszkópos és hisztológiai képe A kép bal oldalán látható neuroendokrin hasnyálmirigy daganatot egy *MEN 1* szindrómás fiatal beteg operációja során distális pancreatectomiával távolították el. A kép jobb oldala a hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit illusztrálja; a daganatban endokrin jellegű sejtekből álló nodulusok trabekuláris (100x) (a) és szolid (200x) (b) szerkezete ismerhető fel hematoxin-eosin festéssel. A daganat synaptophysin (400x) (c), chromogranin A (600x) (d) és neuron specifikus enoláz (400x) (e) pozitivitást mutatott és egy kisméretű nodulusban insulin jelenlétét is ki lehetett mutatni (400x) (f).

A beteg családi anamnézise ugyan nem utalt *MEN1* szindróma lehetőségére, azonban a hasnyálmirigy neuroendokrin daganat multiplex jellege és a társuló lipoma már ekkor felvethette volna atípusos *MEN1* szindróma diagnózisát. A diagnózist azonban csak 2 évvel később állapították meg, amikor a *MEN1* szindróma új tüneteként primer hiperparatireóizist észleltek és mellékpajzsmirigy műtétet végeztek. A genetikai vizsgálatok a probandban egy új, a nemzetközi irodalomban korábban nem ismertetett nonsense *MEN1* génmutáció jelenlétét bizonyították (Q354X). A betegség- okozó mutáción kívül több polimorfizmust is igazoltunk: egy arginint glutaminra cserélő polimorfizmust a 3-as exon (R171Q) és két, aminosavat nem cserélő

polimorfizmust a 9-es exon területén (L432L, D418D). A proband édesanyja és testvére nem hordozták a betegség-okozó mutációt, ezért feltételezhető, hogy a mutáció *de novo* keletkezett, vagy a proband ismeretlen okból korán elhunyt édesapjától örökölhette. Az édesanya a probandban észlelt polimorfizmusok közül a D418D-t heterozigóta formában hordozta, míg a beteg testvérében egyik genetikai eltérés sem volt jelen.

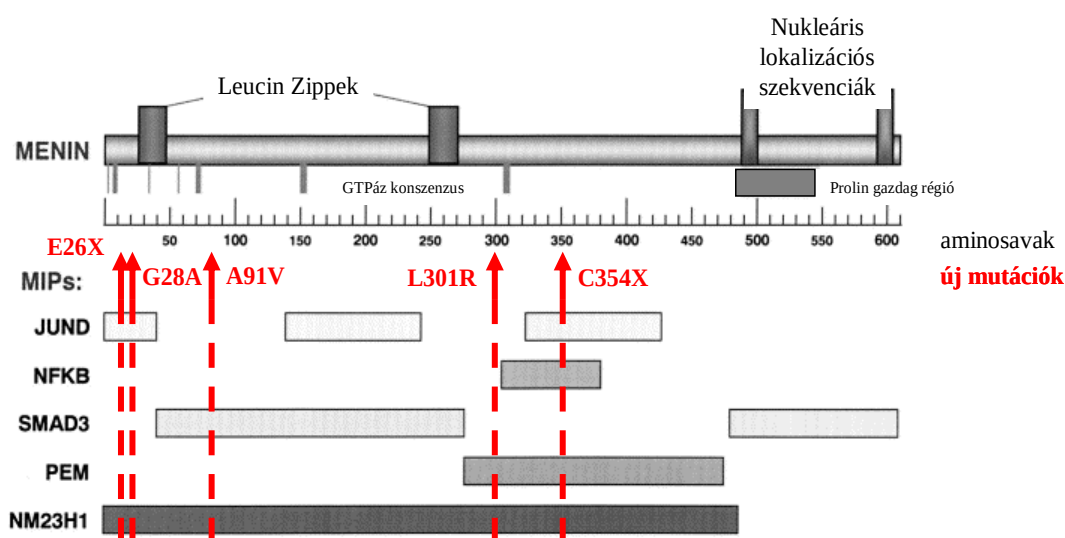
Az általunk igazolt *MEN1* mutációk előfordulási gyakorisága megfelel a nemzetközi adaoknak. Ugyankkor fontos hangsúlyoznunk, hogy a nemzetközi adatok alapján sem egyértelmű, hogy a klinikai kritériumok alapján definiált MEN1 szindrómás családokban milyen gyakorisággal mutatható ki mutáció a *MEN1* gén kódoló régiójában. Egyes vizsgálatok a családok mindössze 5-20%-ában [485], míg más vizsgálatok ennél lényegesen nagyobb gyakorisággal találtak mutációt. Egy 2005-ben közzétett brit felmérés összesen 186, a nemzetközi kritériumrendszer alapján *MEN1* genetikai szűrésre ajánlott család-reprezentáló beteg adatait elemezve megállapította, hogy a betegség-okozó mutációt az esetek 37%-ában lehetett azonosítani. A vizsgált betegek sporadikus és familiáris csoportokba sorolását követően kiderült, hogy a familiáris esetekben a 3, 2 és 1 MEN1-asszociált tumorral rendelkezők körében kimutatott mutációk gyakorisága 91%, 69% és 29% volt (ebben a sorrendben), míg a sporadikus esetekben ugyanebben a sorrendben a mutációk előfordulása 69%, 23% és 0% volt [486]. A MEN1-asszociált léziók nagy száma tehát növelheti annak a valószínűségét, hogy a vizsgált betegben a *MEN1* gén kódoló régiójában mutáció igazolható. Familiáris esetekben a sporadikus esetekhez képest a *MEN1* gén mutációk nagyobb gyakorisággal való kimutathatóságát mások is megfigyelték [487]. Ezeknek az új megfigyeléseknek a tükrében a MEN1 szindróma genetikai szűrésének definíciói újabb szempontokkal egészülhetnek ki, amelyek figyelembe veszik a tünetek familiáris vagy sporadikus megjelenését és a MEN1-asszociált léziók számát. Az általunk vizsgált 33 beteg közül 10 betegben (30,3%) sikerült a *MEN1* gén kódoló régiójában betegség-okozó mutációt kimutatni. A familiáris csoportban a 3, 2 és 1 MEN1-asszociált daganatban szenvedő betegek 100%, 100% és 20%-a, míg a sporadikus esetek körében a 3, 2 és 1 MEN1-asszociált daganatban szenvedő betegek 50%, 5% és 0%-a volt *MEN1* gén mutáció hordozó (**31. táblázat**).

31. táblázat: A *MEN1* gén mutációk előfordulása és a MEN1-asszociált daganatok száma közötti összefüggés betegeinkben

MEN 1 asszociált tumorok száma	Familiáris		Sporadikus	
	N	Mutáció (%)	N	Mutáció (%)
3	2	2 (100)	4	2 (50)
2	4	4 (100)	17	1 (5)
1	5	1 (20)	1	0 (0)
Összesen	11	7 (63)	22	3 (11%)

Azokban a családokban, amelyekben nem sikerült a betegség háttérben álló mutációt kimutatni, a genetikai eltérés a szabályozó vagy nem-kódoló régiókban lehet, de az 5'-szakasz GC-gazdag területének hipermetilációjának oki szerepe sem zárható ki [33,488]. Ezen kívül a *MEN1* gén nagyméretű deléciója, esetleg más gén hibája is szóba jön. Az elmúlt években egy új gén, a *CDKN1B* mutációt azonosították olyan betegekben, akik klinikai fenotípusa nagyon hasonló volt a *MEN1*-ben kimutatható fenotípusokhoz [489]. A szindróma a neuroendokrin rendszert érintő, patkányokban az első életévben kialakuló multiplex tumoros betegséget okozza, melyben az érintett szervek spektruma a *MEN1*- és *MEN2* szindrómák közötti átmenetnek felel meg [490].

Rátérve a betegeinkben azonosított mutációk funkcionális következményeinek tárgyalására a **28. ábrán** látható, hogy a betegeinkben beazonosított mutáció a menin fehérjének funkcionálisan aktív, az egyes interakciós partnerek kötőhelyeit érintik, így patogenitásuk feltételezhető.



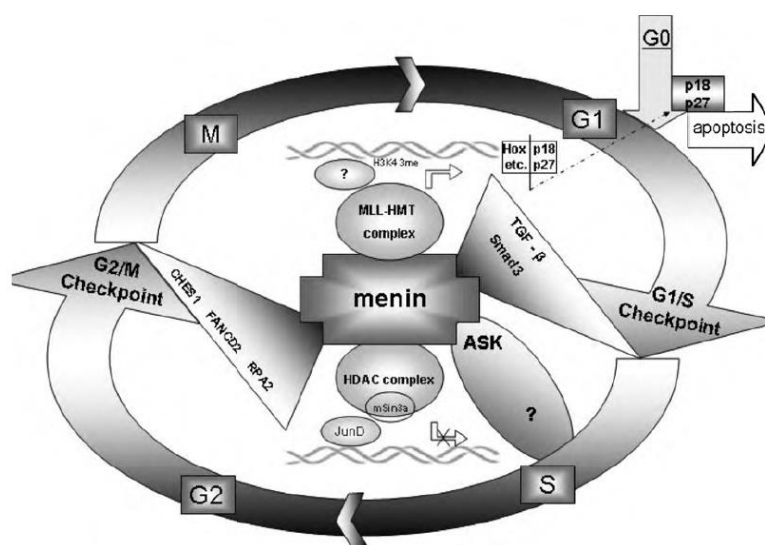
28. ábra: Az általunk talált új mutációk lokalizációja és feltételezett szerepe a menin szerkezetén belül

A G28A mutáció a JunD és nm23 kötőhelyeket kialakító fehérje doméneket érinti és az első leucin zip szerkezetét is átformálhatja. Az érintett családban a mutáció és a klinikai fenotípus közötti összefüggés vizsgálatára nem volt lehetőség, ugyanis a mutáció a probandban *de novo* alakult ki, akinek leszármazottja nem volt. A két aminosav szerkezeti hasonlósága ellenére az alaninnak glicinre cserélődését más fehérjék esetében a nemzetközi irodalomban affinitást befolyásoló tényezőként írták le, azonban a G28A mutáció betegség-okozó szerepét nem tekinthetjük kétséget kizáróan igazoltnak. Az A91V mutáció a Smad3 és nm23 kötő doméneket változtatja meg; ebben az esetben a családfa vizsgálat alátámasztotta a genetikai vizsgálat eredményeit. A családfa elemzése az L301R mutáció esetében is oki kapcsolatra utalt; ez a mutáció a GTPáz konszenzus szekvenciát érinti és a menin-PEM és menin-nm23 kapcsolódást

befolyásolhatja. Az E26X és C354X mutációk csonkolt fehérje képződését okozzák; az első esetben a fehérje mindössze 26 aminosavból áll, míg a második esetben a nukleáris lokalizációs szignálok és a prolin gazdag régió elvesztése mellett a fehérje szinte minden kötési tulajdonsága megváltozhat, ezért oki szerepük kétségtelennek tűnik (28. ábra).

V.1.10. *MEN1* szindrómában előforduló mellékvesedaganatok valamint a menin szerepe a mellékvesekéreg daganatok patogenezisében

Mivel a menin tumorszuppresszor fehérje szerepe a daganatképződés mechanizmusában mai napig nem kellően tisztázott többször is kutatásom előterébe került. Számos összefoglalást készítettünk abból a célból, hogy a saját kísérletes munkánkhoz is kiindulási pontokat, hipotéziseket állítsunk fel.



29. Ábra: a menin szerepe a sejtciklus szabályozásában

Az irodalmi adatok és a saját *MEN1* gén mutációsűrésével kapott eredményeink is igazolják, hogy a meninnek a mellékvesekéreg adenómák kialakulásában csekély a szerepe. Saját beteganyagunkban a *MEN1* mutáció előfordulására a mellékvesedaganatok jelenléte nem bírt pozitív prediktív értékkel. Ezt számos nemzetközi munkacsoport szintén megerősítette [2,485,488]. A mellékvesedaganatok előfordulása igazolt *MEN1* szindrómás betegekben a különböző nemzetközi populációkban a 8-55% között változott. Ennek a tág intervallumnak a magyarázata az, hogy a *MEN1* genetikai vizsgálatára különböző indikációkat alkalmaztak.

Ha a mellékvesedaganatok genetikai vizsgálatából indulunk ki, szintén azt a konklúziót kell levonnunk, hogy a *MEN1* gén nem tartozott a mutációs hotspot-ok közé. Természetesen a korai vizsgálatok, amelyek a daganatokban kimutatható LOH-t vizsgálták a *MEN1* gén kromoszomális

lokalizációját is tartalmazó régió elvesztését (11q13) gyakran igazolták. Ez arra utalhat, hogy ebben a régióban egy másik, a *MEN1*-től eltérő tumorszuppresszor gén is lokalizálódhat [8,137]. Ugyanakkor fontos kiemelni azt is, hogy a *menin* számos olyan fehérjével kerül interakcióba, amelyek szerepe bizonyított a tumorigenézisben és pl. a sejtciklushoz kapcsolódó eltérések a mellékvesedaganatok jellemzői, igaz elsősorban a rosszindulatú mellékvesekéregráké (29. Ábra).

V.1.11. Nemzetközi együttműködés során igazolt genotípus-fenotípus összefüggések *MEN2* és örökletes *Phaeo/PGL*-ákban

Az örökletes endokrin tumorszindrómák ritka kórképek. Egyetlen kisebb lakosságú ország sem képes olyan számú beteg feldolgozására, ami elegendő statisztikai erőt jelentene a genotípus-fenotípus összefüggések pontos meghatározására. Kutatómunkám során fontos célom volt résztvenni olyan nagy esetszámú vizsgálatokban, amelyek biztosították a releváns összefüggések felismerését. A hazai betegekben elvégzett genetikai vizsgálatok és a tudományos eredményeink révén több multicentrikus tanulmányba kaptunk meghívást.

A *RET* TGC634TGG (p.Cys634Trp) mutációt hordozó *MEN2* szindrómás esetek feldolgozásával először határoztunk meg kodon és mutáció specifikus genotípus-fenotípus összefüggéseket. Összesen 92 esetet (20 családból) sikerült beazonosítani Amerikai és Európai centrumokban. 68 esetben az MTC diagnózisa volt az első eltérés, átlagosan a 29. életévben manifesztálódott. A betegek közül 16 esetben nyirokcsomó, 4 esetben távoli metasztázis is jelentkezett. *Phaeochromocytoma* 41 esetben manifesztálódott (átlagosan a 36. életévben). Hat esetben a *Phaeo* megelőzte az MTC kialakulását. Primér mellékpajzsmirigy adenoma csak 6 esetben volt kimutatható. Nyolc beteg *Phaeo*, 4 beteg MTC miatt hunyt el. Az MTC penetranciája a 30. életévre 52%, de az 50. életévben már 83 % volt. A *Phaeo* esetében a 30. életévben 20%, az 50. életévben 67%, míg a PHPTpenetranciája mindössze 3% a 30. életévben és 21% az 50. életévben. Ezek az adatok bizonyítják, hogy *MEN2* szindrómában a mutáció-specifikus összefüggéseknek az ismerete segíti a mindennapi klinikai munkát és ezeknek az adatoknak az ismeretével érhető el a betegek és a mutációt hordozók legjobb túlélése [491].

Kiterjesztve az első vizsgálatunkat, ugyanebben a konzorciumban elvégeztük az összes *RET* 10-es exon mutációt hordozó feldolgozását a nemzetközi *RET* Exon 10 Konzorcium keretében. A 10-es exon mutációkról ellentmondásos összefüggések is publikálásra kerültek kisebb tanulmányokban, ami több zavaró összefüggést állapított meg. A 15 ország 27 centrumában 103 család 340 érintettjének elemzésével összesen 21 különböző *RET* mutációt detektáltunk. MTC 263 érintettben, *Phaeo* 54 és HPT 8 esetben manifesztálódott. Az MTC-vel diagnosztizált esetek 53%-a, a *Phaeo*-s esetek 54%-a klinikai tünetmentes állapotban, a szűrések következtében kerültek felismerésre. Az MTC-re kodon specifikus penetranciát és rizikóbecslést lehetett meghatározni, ami

igazolta, hogy a metasztázis megjelenése összefüggött az érintett kodon mutációval. A 609-es kodon mutációk esetén a legkisebb, míg a 620-as kodon esetén volt a legnagyobb a metasztázis kialakulásának rizikója. Ezek az eredmények igazolták, hogy még ugyanakkor az exonnak a különböző régióinak a mutáció is eltérő fenotípust okoznak. A kodon-specifikus genetikai tanácsadás és beteg nyomonkövetés szükséges ezekben az esetekben is [492].

A Phaeo-al kapcsolatban az Európai-Amerikai-Pheochromocytoma-Paraganglioma-Regisztrar 2001 betegének feldolgozásával két lényeges kérdésben foglalmaztunk meg szakmai javaslatokat. Az egyik, a 18 évesnél fiatalabb betegekre vonatkozott. A 177 regisztrált eset közül, a betegek 80%-a hordozott csírasejtes mutációt valamelyik génben. Az esetek felében *VHL* mutáció volt kimutatható. A többi gén csökkenő sorrendben a következő volt: 15% *SDHB*, 10% *SDHD*, 4% *NF1* és egy betegben *RET*, *SDHA* és *SDHC* eltérés is kimutatható volt. Gyermekkorban nagyon fontos ismerni azt, hogy a következő daganat megjelenése milyen életkorban várható. Felmérésünk alapján második daganat az esetek 38%-ában jelentkezett, az életkor előrehaladtával nőtt ennek az esélye, a 30. életévre elérve az 50%-ot. A második daganat megjelenése *VHL* és *SDHD* mutációt hordozókban volt a legvalószínűbb. Másik fontos kérdés a daganatok dignitása. Bár a Phaeo/PGL-k ritkán malignusak, a szisztematikus adatelemzés kimutatta, hogy gyermekkorban is előfordulnak malignus daganatok (16 esetben, 9%-ban igazoltunk), amelyek szinte kizárólag *SDHB* mutációkhoz társultak. Az átlagos várható élettartam 62 év volt az örökletes esetekben [493].

Az utolsó két nagy vizsgálatunkban is a phaeochromocytoma volt a vizsgálat célja. A MEN2 szindrómában kialakuló Phaeo kezelésére vonatkozó adatokat elemeztük egy multicentrikus vizsgálat keretein belül. Összesen 1210 MEN2 szindrómában szenvedő beteg adatait dolgoztuk fel. 563 esetben alakult ki Phaeo, akik közül 552 beteg eset át sebészeti kezelésen. 438 (79%) esetben adrenalectomia, 114 (21%) betegben a mellékvesekéreg megtartásával történt a műtét. Rekurrens Phaeo az esetek 3 és 2%-ában fordult elő. Mellékvesekéreg-elégtelenség és glükokortikoid pótlásra a 339 kétoldali Phaeo-s beteg közül 292 (86%) esetben volt szükség, míg a 82 kétoldali, mellékvesekéreg-megtartásával műtött beteg közül 47 esetben (57%) nem alakult ki mellékvesekéreg-elégtelenség. Eredményeink igazolják, hogy MEN2 szindrómában, ahol várható a kétoldali daganatok kialakulása, a mellékvesekéreg-megtartó műtétek végzése javasoltak, a későbbi mellékvesekéreg-elégtelenség elkerülésének érdekében [494].

Az újonnan azonosított Phaeo/PGL gének szükségessé tették, hogy felmérjük ezek előfordulási gyakoriságát a nagy endokrin központokban, és javaslatokat foglalmazunk meg az új gének molekuláris genetikai vizsgálatával kapcsolatban. Összesen 972 sporadikus Phaeo/PGL-val diagnosztizált betegben kerültek vizsgálatra az új gének (*MAX*, *TMEM127*, *SDHA*, *SDHAF2*). 58 (6.0%) esetben került beazonosításra mutáció valamelyik új génben (29 *SDHA*, 20 *TMEM127*, 8 *MAX* és 1 *SDHAF2*). Az 58 eset közül 53 esetben vagy familiáris vagy multiplex vagy extra-

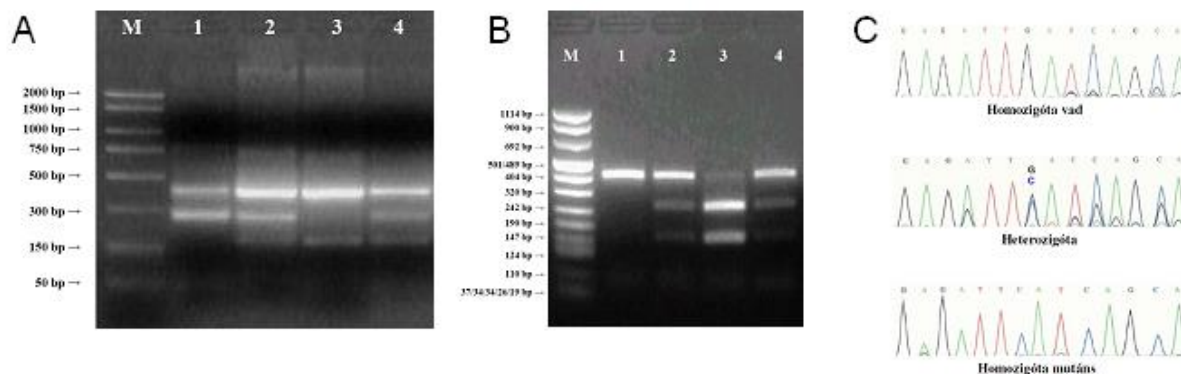
adrenalis vagy malignus daganat volt a diagnózis. Említésre érdemes, hogy ezek a betegek 40 évesnél fiatalabbak voltak. Legfiatalabb életkorban (8 évesen) *SDHA* mutáció talaján alakult ki daganat. Extra-adrenalis tumor is gyakori volt *SDHA* mutációkhoz társulva (23 a 29 *SDHA* hordozóban; 79%). *MAX* mutáció mellékvesére lokalizált Phaeo-ra volt jellemző. A konzorcium állásfoglalása alapján az újonnan felfedezett gének mutáció analízise is indokolt Phaeo/PGL-s betegekben elsősorban a fiatal, kétoldali, malignus vagy extraadrenalis lokalizációjú esetekben. Génspecifikus tanácsadás és folyamatos klinikai nyomonkövetés ajánlott a mutációt hordozó betegeknek [461].

V.2. Sporadikus daganatokban igazolt genetikai, epigenetikai eltérések és az ezekhez társult pathomechanizmus

V.2.1. A *GR* N363S variánsának szerepe jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenezisében, új PCR módszer a *GR* gén *BclI* polimorfizmus kimutatására

A jóindulatú mellékvesekéreg adenómák gyakori eltérések. Hátterük tisztázatlan, de a kétoldali megjelenés és a betegek hormonvizsgálatai felvetették, hogy patogenezisükben a károsodott glükokortikoid hatásnak szerepe lehet. A *GR* gén gyakori polimorfizmusai közül az N363S a fokozott glükokortikoidok iránti érzékenységgel mutatott összefüggést. Vizsgálataink költséghatékony módon történő kivitelezéséhez a *GR* polimorfizmusok vizsgálatához allél-specifikus PCR-t terveztünk, így egy csőben a normális és mutáns allélok gyorsan és olcsón kimutathatóakká váltak. A módszert Sanger szekvenálással validáltuk. Két ún. belső primert terveztünk a polimorfizmus okozta C-G csere kihasználásával. Egy a vad allélra specifikus reverse primert (VR: 5'-CAATTCCTCTCTTAAAGAGATTG-3'), és egy a mutáns allélra specifikus forward primert (MF: 5'-GACAAGTTATGTCTGCTGATG-3'). Kontroll fragmens létrehozására 154 bp távolságra 5'-, valamint 263 bp távolságra 3'-irányban ún. külső primerpárt terveztünk, mellyel a vizsgált régió egy 418 bp méretű fragment formájában volt amplifikálható (F: 5'-AGAGCCCTATTCTTCAAACACTG-3', R: 5'-GAGAAAT TCACCCCTACCAAC-3'). Az allélspecifikus PCR kivitelezése során a PCR termociklusa 5 perces 95 °C-on történő elődenaturációt követően 35 ciklusban: 95 °C – 1 perc, 56 °C - 1 perc és 72 °C 1,5 perc volt, melyet egy 10 perces végső extenziós lépés követett, majd a reakcióelegy 4 °C-ra került lehűtésre. Az 50 µl végtérfogató 10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 50mMKCl és 5% glicerint tartalmazó pufferoldatba 100 ng DNS, 2 NE (nemzetközi enzimaktivitás egység) Taq polimeráz, 25-25 pM mind a 4 primerből egyenként és 0.2 mM/l dNTP került. A PCR során keletkező fragmentumokat 2 %-os agaróz gélelektroforézissel választottuk szét és etídium-bromid, valamint ultraibolya fény

felhasználásával tettük láthatóvá. A gélelektroforézist követően DNS markerlétra mellett olvastuk le a fragmentek méretét (PCR marker, 50–2000 bp Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

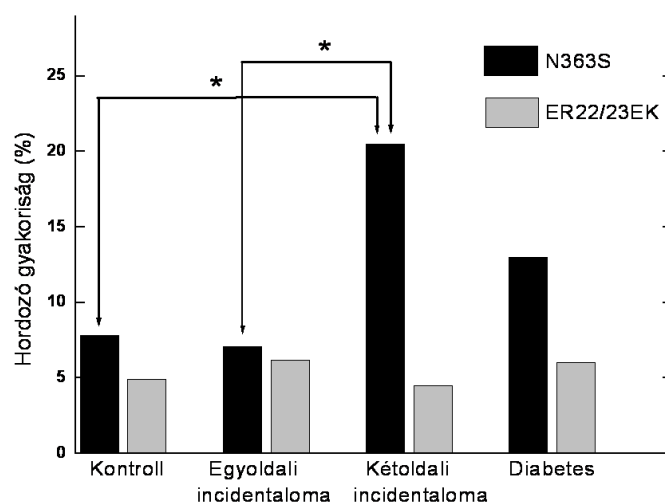


30. Ábra: A *GR* BclI polimorfizmus kimutatására kidolgozott allélspecifikus PCR módszer és annak ellenőrzése restriktions enzimemésztéssel és DNS szekvenálással.

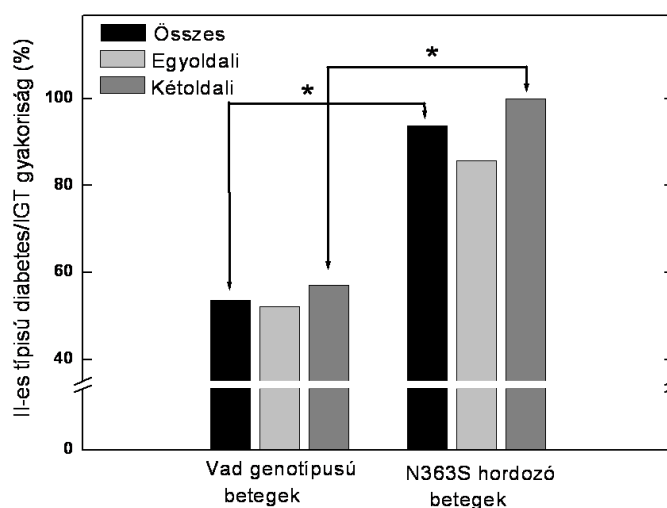
Panel A: Bcl I polimorfizmus allélspecifikus PCR módszerrel való kimutatása: 1. oszlop: homozigóta mutáns (kontroll és csak 177 bp méretű fragment), 2. és 4. oszlop: heterozigóta (kontroll, 284 bp és 177 bp méretű fragment), 3. oszlop: homozigóta vad (kontroll és csak 284 bp méretű fragment) genotípus; Panel B: M: DNS marker, 1. oszlop: homozigóta mutáns (csak emésztetlen 418 bp méretű fragment), 3. oszlop: homozigóta vad (hiányzó 418 bp méretű fragment mellett kettő kisebb fragment (151 és 267 bp)), 2. és 4. oszlop: heterozigóta (csökkent intenzitású 418 bp méretű fragment mellett kettő kisebb fragment (151 és 267 bp)) genotípus; Panel C: A *GR* BclI SNP szekvenálási képe, vad, heterozigóta és homozigóta formában [495].

A *GR* gén BclI polimorfizmusának kimutatására kidolgozott allélspecifikus PCR módszer 247 egészséges kontroll egyén genomiai DNS-én tesztelve két független módszerrel történő validálás alapján megbízható eredményt adott minden esetben. A kapott genotípus és allélfrekvencia eloszlás eredménye megfelelt a kaukázusi populációnál várt 35% körülinek. A kidolgozott módszer költséghatékony, rövid idő alatt, a korábbiaknál kevesebb lépésben végrehajtható, nagy mintaszám esetén is magas szenzitivitással és specificitással alkalmazható, ezáltal populációs szintű vizsgálatokra is alkalmas.

A *GR* N363S variánsa szignifikánsan gyakoribb volt a kétoldali mellékvesekéreg adenómás betegekben, mint az egyoldali, vagy diabeteses vagy kontroll csoportban (20.5% vs. 7.1%, 13% és 7.1%). A 2-típusú diabetes gyakoribb volt a kétoldali adenómás csoportban, mint az egyoldali adenómások között (40.9 vs. 22.2%, $P < 0.05$). Ebben a csoportban az N363S variáns összefüggést mutatott a károsodott cukoranyagcserével, de a BMI, hiperlipidémia, magasvérnyomás vagy koronária betegséggel nem társult. Eredményeink arra utalnak, hogy a *GR* N363S polimorfizmusa a szénhidrát anyagcserén keresztül szerepet játszik a kétoldali, hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenómák patogenezisében [496].



31. ábra. A glükokortikoid receptor gén N363S és ER22/23EK polimorfizmusát hordozók gyakorisága a különböző klinikai csoportokban. *statisztikailag szignifikáns különbség.



32. ábra. Cukoranyagcsere zavar (diabetes mellitus és/vagy csökkent glükóz tolerancia) gyakorisága az N363S polimorfizmust nem hordozó illetve hordozó mellékvese adenomás betegekben. *statisztikailag szignifikáns különbség.

Nem találtunk összefüggést az N363S polimorfizmus jelenléte és a hipertónia, hyperlipidaemia, vagy a koszorúér betegség előfordulása között.

Az N363S polimorfizmus megnövekedett *in vivo* glükokortikoid érzékenységgel társul [146,168] és *in vitro* körülmények között megnöveli a GR transzaktivációs képességét [150]. Mások felvetették, hogy a polimorfizmusnak a GR transzaktivációs doménjéhez közeli elhelyezkedése miatt az aszparagin cseréje szerinre egy új potenciális foszforilációs helyet teremt, amely növelheti a receptor transzaktivációs képességét [497]. Korábbi vizsgálatok azt is felvetették, hogy az N363S variáns összefüggést mutathat számos metabolikus rendellenességgel, köztük a cukoranyagcsere

zavarral is, bár nagyon eltérő eredményekről számoltak be. Felmerült, hogy az N363S hordozókban megfigyelt metabolikus eltérések hátterében az állhat, hogy az inzulin termelés fokozott érzékenységgel reagál a kortizol koncentráció változásaira [162] és az N363S polimorfizmus szerepet játszhat a 2-es típusú diabétesz kialakulásában. Ezzel ellentétben mások és saját vizsgálataink nem találtak összefüggést az N363S variáns és a diabétesz illetve a cukoranyagcsere között egészséges, random vagy diabéteszes mintákban [168,498–500]. Nem zárható ki azonban, hogy a GR megnövekedett transzaktivációs képessége következtében olyan target gének transzkripciója fokozódhat, melyek mind a kétoldali mellékvese adenoma képződésben, mind ezekben a betegekben a diabétesz gyakori előfordulásában szerepet játszhatnak.

A glükokortikoidok iránti érzékenység növekedése miatt N363S genotípusú egyéneknél inzulinrezisztencia és hiperinzulinémia alakulhat ki, és a megnövekedett inzulin szint tumor képződést indukálhat. Régóta ismert, hogy a túlzott glükokortikoid hatás elősegíti az inzulin rezisztencia és diabétesz kialakulását. Az N363S polimorfizmus dexametazon hatásra nagyobb inzulin növekedéssel társul [146]. NCI-h295 sejtvonalon végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy az inzulin a mellékvesekéreg sejtek proliferációját serkenti anélkül, hogy a kortizol szintézist befolyásolná [126]. Ezek a korábbi megfigyelések alátámaszthatják feltételezésünket, hogy az N363S polimorfizmus a glükokortikoidok iránti érzékenység növekedése miatt hyperinsulinaemiát okoz, ami N363S polimorfizmust hordozó egyéneknél szerepet játszhat mind a kétoldali mellékvese daganat, mind a diabétesz kialakulásában. Kutatómunkám során azonban inzulin koncentrációt nem mértünk, így ennek a hipotézisnek a további megalapozásához új vizsgálatokra van szükség. A megnövekedett kortizol szint és az inzulin rezisztencia, hiperglikémia kapcsolatát több tanulmányban vizsgálták. Egy tanulmányban elhízott diabéteszes betegek 2-5,5%-ában találtak szubklinikai Cushing szindrómát, illetve a HPA tengely enyhe eltéréseit [501]. További érdekes megfigyelés, hogy normális kortizol szint mellett cukorbetegben a glükokortikoidok iránti fokozott érzékenységet mutattak ki, ami a fiziológiás mennyiségű kortizol túlzottan erős hatásának tulajdonítható [502]. Lehetséges tehát, hogy a HPA tengely feedback érzékenysége genetikailag meghatározott egyéni variabilitása [146] fontos klinikai következményekkel is járhat.

Korábbi vizsgálatokban az N363S polimorfizmusnak számos metabolikus rendellenességgel való összefüggését tanulmányozták, de a BMI-re, energia háztartásra, vérzsírokra és koszorúér betegségre vonatkozó eredmények ellentmondásosak [146,162,498,499]. Magunk nem találtunk összefüggést az N363S variáns és a testtömeg index között, bár az egy- és kétoldali mellékvesekéreg daganatos valamint a 2-es típusú diabéteszes betegekben hasonló mértékben megnövekedett BMI-t találtunk, az N363S polimorfizmus csak a kétoldali mellékvese daganatos betegekben fordult elő gyakrabban. Ennek alapján valószínűtlennek tűnik, hogy a kétoldali

mellékvese adenomás betegekben az N363S polimorfizmus gyakori előfordulása a betegek jellemző nagyobb BMI-vel állna összefüggésben.

V.2.2. A *C4B* gén kópiaszámának hatása valamint a *CYP21A2* gén gyakori variánsainak hatása az *ACTH* stimulációt követő kortizol válasza jóindulatú mellékvesekéreg adenomás betegekben

A fokozott glükokortikoid hatás szerepének a jóindulatú mellékvesekéreg adenomás betegek további vizsgálata során a *CYP21A2* gén tágabb kromoszómarégiójának genetikai asszociációs vizsgálatait végeztük el. A *CYP21A2* gén patogén mutáció a 21-hidroxiláz enzimdefektust okozza, ahol az enzim különböző mértékű károsodása jön létre. A *CYP21A2* genomi lokalizációja rendkívül bonyolult, ún. kópiaszámváltozásokat mutató szakaszokon található. A régió egyik tagja a komplement komponens 4-t kódoló *C4B* gén is. A *C4B* gén egyik haplotípusáról (*C4B*Q0*) ismert volt, hogy összefüggést mutatott különböző cardiovascularis megbetegedésekkel. Mivel a mellékvesekéreg hormonok közül a kortizol és aldosteron is szerepet játszik a vérnyomás és szívműködés szabályozásában és a *C4B*Q0* összefügghet a *CYP21A2* génnel feltételeztük, hogy a korábbi hatásokért is ennek az enzimnek a genetikai variánsai tehetők felelőssé. Vizsgálatainkhoz olyan betegeket vontuk be, akiktől rendelkezésre állt alap és stimulált hormonvizsgálati eredmények. Összesen 77 mellékvesekéreg adenomás beteget vizsgáltunk.

32. Táblázat: A *C4BBQ0* haplotípus összefüggése ACTH-stimulált kortizol és aldosteron koncentrációkkal

Változó	Odds ráció (95% konfidencia intervallum)	P érték
Kortizol index: az ACTH stimulált és az alap kortizol koncentrációk arány		
O vagy 1 kópiával rendelkező betegek a több kópiás beteghez viszonyítva	25.12 (2.80–225.48)	0.04
Daganatméret	1.02 (0.98–1.06)	0.280
Életkor	0.99 (0.93–1.07)	0.964
Nem nő/férfi	0.22 (0.05–1.03)	0.055
Aldosteron index: az ACTH stimulált és az alap aldosteron (nmol/l) arány		
O vagy 1 kópiával rendelkező betegek a több kópiás beteghez viszonyítva	10.33 (1.49–71.45)	0.018
Daganatméret	0.95 (0.88–1.03)	0.233
Életkor	1.08 (0.97–1.19)	0.154
Nem nő/férfi	0.59 (0.05–7.36)	0.687

Ahogy az a **32. táblázatban** látszik mind az kortizol mind pedig az aldosteron index (az alap és az ACTH-stimulált hormon koncentrációk arány) szignifikánsan magasabb voltak a

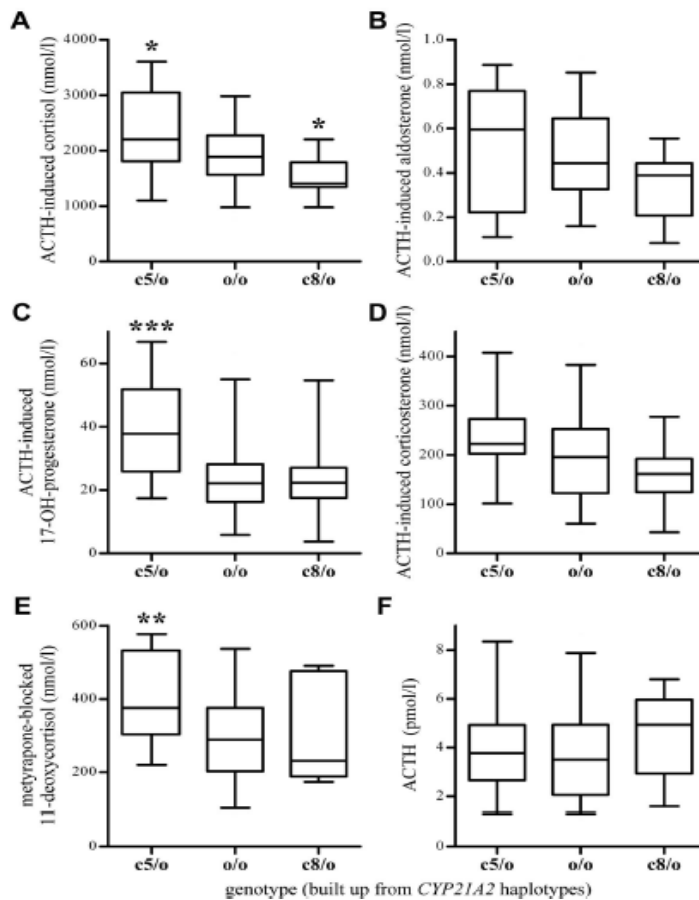
*C4B*Q0* hordozókban, mint a nem hordozókban (**32. táblázat**), de nem találtunk különbséget a 17-OHP koncentrációkban, ami arra utal, hogy az eltérésekért a szteroid bioszintézis későbbi lépései lehetnek felelősek. Legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a 21-hidroxiláz által katalizált lépés volt aktívabb a hordozókban a nem hordozókhoz képest. A vizsgálatban résztvevőktől rendelkezésünkre állt az ACTH alap és metyrapon utáni koncentrációi is, ami azt mutatta, hogy a hordozókban alacsonyabb volt mind az alap ACTH mind pedig a metyrapon adása után mért koncentráció is. Az eredmények függetlenek voltak a nemtől, életkortól és a daganat méretétől. Az alap és a stimulált hormon koncentrációk is a referencia tartományon belül voltak, ami kizárja azt, hogy a vizsgálatban résztvevő egyének aktív hormonális betegségben szenvedtek volna, pl. ún. late onset congenitalis adrenalis hyperplasiában (21-hidroxiláz enzimdefektusban). Mindezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a *C4B*Q0* haplotípust hordozókban a mellékvesekéreg aktivitása nagyobb mint a nem hordozókban. Ez azt is jelentheti, hogy ezekben az egyéneken stresszhelyzetben nagyobb a glükokortikoid hormontermelés, ami kedvezőtlen hatásokat (magas vérnyomás, elhízás, cukorbetegség, csonttritkulás) eredményezhet [503].

A HPA tengely fokozott aktivitását összefüggésbe hozták cukorbetegség és szívérrendszeri betegségek kialakulásával is [504,505]. A HPA tengely hiperaktivitás kedvezőtlen hatásáért nem csak a kortizol, hanem az aldoszteron is felelőssé tehető. A hiperaldoszteronizmus nehezen kezelhető, terápiarezisztens magasvérnyomás kialakulásával jár együtt. Eredményeink ugyan a normál tartományon belüli aldoszteron koncentrációkat mutattak a *C4B*Q0* hordozókban is, kizárva hiperaldoszteronizmus lehetőségét, de az ACTH stimulációt követően mért reakció a hordozókban magasabb volt mint a *C4B*Q0* allélt nem hordozókban. A *C4B*Q0* hordozókról a korábbi vizsgálatok igazolták, hogy ez az allél összefüggést mutatott a túléléssel [506,507] és a dohányzás ezekben az egyéneken emelte a szívérrendszeri betegségek morbiditását és mortalitását [508]. Feltételezhetjük, hogy ezekért az összefüggésekért a *C4B*Q0* hordozókban az élethosszon át tartó, genetikailag determinált fokozott stresszválasz is felelőssé tehető [509].

A *C4B*Q0* hordozókban kimutatott hormonválaszok arra utaltak, hogy a 21-hidroxiláz enzim aktivitása lehet a kulcsa a tapasztalt összefüggéseknek, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük a *CYP21A2* génre. A gén bonyolult kromoszomális szerkezete miatt speciális molekuláris biológiai módszereket (allél-specifikus long range PCR, MLPA, kvantitatív PCR) használtunk a *CYP21A2* haplotipizálásához. A *CYP21A2* variánsokkal sikerült a *C4B*Q0* allélt is lefednünk, így a *CYP21A2* gén gyakori SNP-i alkalmasak a teljes RCCX modul jellemzésére. A *CYP21A2* génen belül az SNP-kben rendkívül gazdag 2-es intron régió önmagában jellemzi a *CYP21A2* haplotípusokat [510].

A populációt a *CYP21A2* génvariánsok alapján három nagy haplotípusba lehetett sorolni. Ezek közül az ún. c5 haplotípusba tartozókban emelkedett kortizol és 17-hidroxiprogesteront

mértünk ACTH-stimulációt követően, míg az rs6462 polimorfizmust hordozókban az aldoszteron koncentráció volt emelkedett.

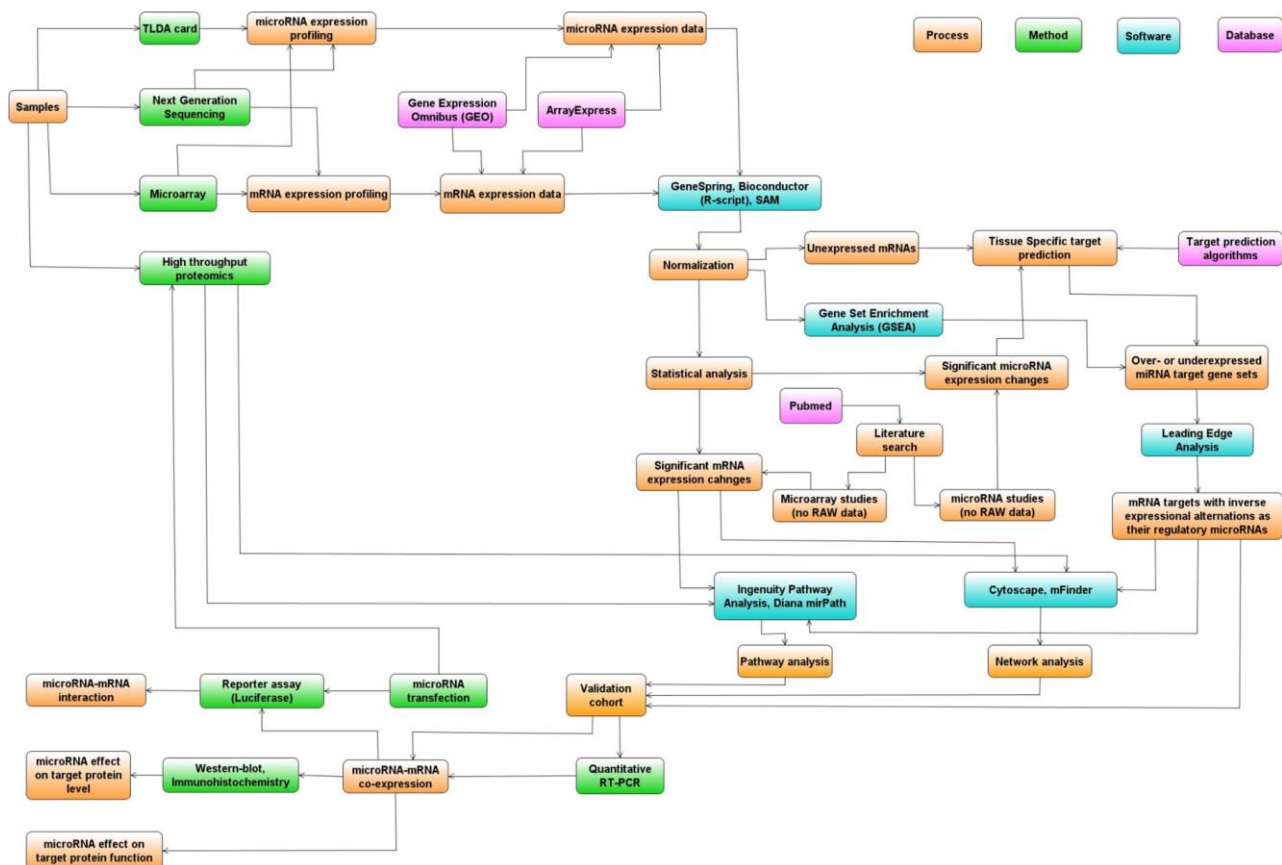


33. Ábra: A CYP21A2 gén haplotípusok összefüggése az ACTH-stimulált kortizol (A), aldoszteron (B), 17-hidroxiprogoszteron (C), kortikoszteron (D) és metyrapon utáni 11-deoxycortisol (E) és ACTH (F) koncentrációkkal.

A két vizsgálatot összegezve sikerült az RCCX modulon belül feltérképezni azt a haplotípust, ami feltehetően az egyéni stresszre adott válaszban szerepet játszik [511].

V.2.3. Nagy átereszkőképességű módszerek integrálása, funkcionális kapcsolatok modellezése

Kutatómunkám egybeesett a molekuláris biológiai módszerek rohamos fejlődésével. A nagy átereszkőképességű vizsgálatok (microarray, új generációs szekvenálás) és ezek eredményei ingyenesen elérhető adatbázisokban történő elhelyezése lehetővé tette, hogy a vizsgálataink tárgyát képező ritka betegségekről is elérhető mérési eredményeket hasznosítani tudjuk. Az integratív adatelemzés és ezek átültetési a klinikai gyakorlatba vezetett oda, hogy kidolgozzunk egy olyan munkafolyamatot, ami tartalmazza az adaelemzést, az irodalmi adatok feldolgozását, a validációs kísérletek tervezését és a funkcionális módszerek integrálását [512].



34 ábra: az integratív adatelemzés sematikus ábrája. Az ábra bal felső harmadában a fehérje, gén és mikro-RNS mérések munkafolyamatát ábrázoltuk. Ezeket különböző nagy áteresztőképességű módszerekkel (új generációs szekvenálás-NGS., microarray, TLDA kártyák) elvégzett mérésekhez lehet letölteni az ingyenesen elérhető adatokat (pl. GEO és Omnibus adatbázisokból) majd a közös adatokat a megfelelő programokkal újraértékelni (Bioconductor, Genescript, R-scriptek). Az ábra középső része tartalmazza a bioinformatikai és az irodalmi adatok feldolgozását (statisztikai módszerek: normalizálás, expresszió különbségek és szignifikáns eltérést mutató molekulák azonosítását. GSEA, leading edge, cytoscope és IPA algoritmusok segítségével az adatok vizualizálhatóak és statisztikailag jellemezhetőekké válnak. A mikro-RNS adatok interpretálása és a potenciális cél mRNS beazonosítása szintén ebben a fázisban következik be. Az ábra bal alsó harmadában a beazonosított összefüggések funkcionális tesztelésére kidolgozott folyamatokat összegeztük. Itt kerül sor az in vitro és in vivo kísérletekre. A mikro-RNS-ek funkcionális hatásainak elemzésében mikro-RNS transzfekciót követő mikro-RNS DNS interakció, a potenciális fehérje koncentrációjának mérése mikro-RNS transzfekciót követően, és a biológiai funkciók (pl. sejtproliferáció, apoptózis, hormontermelés) elemzésére. Sárga szín: folyamatokat (process), zöld kiemelés: módszereket (method), kék szín: softwareket, algoritmusokat, a lila szín: adatbázisokat szemléltet.

A kidolgozott stratégiánkat sikeresen alkalmaztuk a hipofízis és a mellékvesekéreg daganatok elemzésében, valamint felhasználtuk a GR β funkcióinak jellemzésében és a sejtciklus elemzésében is.

V.2.4. A GR izoformáinak szerepe mellékvesekéreg daganatokban

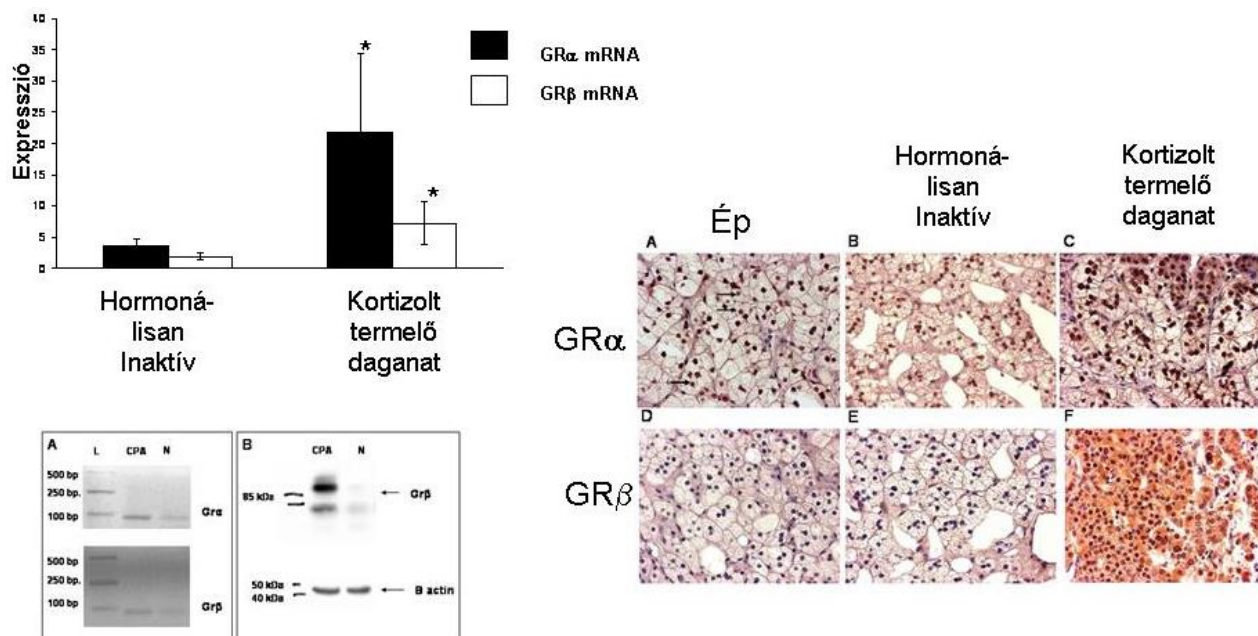
A genetikai asszociációs vizsgálatokból körvonalazódott, hogy az intraadrenalis glükokortikoid érzékenység szerepet játszat a jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenezisében. Ezek alapján a következő kérdés volt, hogy igazoljuk a glükokortikoid hatást közvetítő receptor jelenlétét mellékvese szövetekben. Összesen 31 mellékvese szövetet (19 hormonálisan inaktív, 6 kortizolt termelő adenóma és 6 ép mellékvese szövetet) vizsgáltunk (33. táblázat). Az ép mellékvesék nefrektómia során eltávolított vesék mellől származott.

33. Táblázat: a GR izoformák vizsgálatában felhasznált mellékveseszövetek

Szövetszáma	Nem	Mellékvese tumor (mm)	Életkor (évek)	Hormonális aktivitás	Szövettani diagnózis
1	Férfi	–	30	–	Ép mellékvesekéreg
2	Nő	–	57	–	Ép mellékvesekéreg
3	Férfi	–	61	–	Ép mellékvesekéreg
4	Nő	–	51	–	Ép mellékvesekéreg
5	Férfi	–	21	–	Ép mellékvesekéreg
6	Nő	–	54	–	Ép mellékvesekéreg
7	Nő	40×30×10	64	Inaktív	adenoma
8	Nő	50×50×10	48	Inaktív	adenoma
9	Nő	35×10×6	46	Inaktív	adenoma
10	Nő	22×15×15	51	Inaktív	adenoma
11	Férfi	30×20×20	52	Inaktív	adenoma
12	Nő	30×30×27	41	Inaktív	adenoma
13	Nő	50×50×30	65	Inaktív	adenoma
14	Nő	50×40×30	38	Inaktív	adenoma
15	Férfi	60×30×30	54	Inaktív	adenoma
16	Nő	60×50×50	46	Inaktív	adenoma
17	Nő		40	Inaktív	adenoma
18	Férfi	20×20×15	68	Inaktív	adenoma
19	Nő	50×50×30	65	Inaktív	adenoma
20	Nő	20×20×20	61	Inaktív	adenoma
21	Nő	30×30×30	31	Inaktív	adenoma
22	Nő	10×10×5	50	Inaktív	adenoma
23	Nő	50×30×25	43	Inaktív	adenoma
24	Férfi	40×40×30	43	Inaktív	adenoma
25	Nő	60×20×30	52	Inaktív	adenoma
26	Nő	50×30×20	51	Kortizolt-termelő	adenoma
27	Nő	25×20×15	36	Kortizolt-termelő	adenoma
28	Nő	25×20×20	39	Kortizolt-termelő	adenoma
29	Nő	80×30×20	59	Kortizolt-termelő	adenoma
30	Nő	40×40×25	54	Kortizolt-termelő	adenoma
31	Férfi	90×90×90	55	Kortizolt-termelő	adenoma

Kvantitatív RT-PCR-el mRNS, míg GR α és GR β specifikus antitestekkel végzett immunhisztokémia vizsgálatokkal kimutattuk mindkét izoforma jelenlétét mellékvesedaganatokban. A hormonálisan inaktív adenómákhoz képest és az ép szövetekhez

viszonyítva is mind a GR α mind pedig a GR β fokozott expressziót mutatott a kortizolt termelő daganatokban (35. ábra). Az ép szövetek közül a GR β 3-ból 6-ban, a hormonálisan inaktív daganatokban 19-ből 17-ben míg az összes (6-ból 6-ban) kortizolt termelő daganatokban jelen volt. A két izoforma között mRNS expresszióban szignifikáns pozitív korrelációt detektáltunk.



35. Ábra: a GR izoformák expressziója mellékvese daganatokban. GR α és GR β génexpresszió(bal felső kép); a GR α és GR β antitestek specificitásának ellenőrzésére végzett Western blot reprezentatív képe (bal alsó kép) és a GR α és GR β immunhisztokémiával történő detektálása ép, hormonálisan inaktív és kortizolt termelő mellékvese daganatokban. (CPA: kortizolt termelő adenóma, N: normál szövet, bp: bázispár)

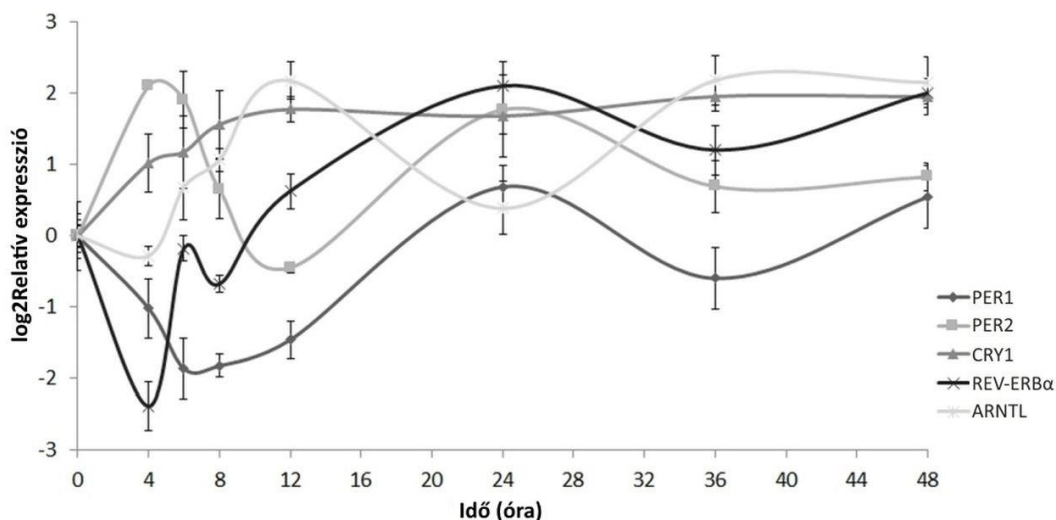
Eredményeink megerősítik Hagendorf és mtsai. korábbi eredményeit, akik Cushing szindrómás betegek perifériás vérében keringő mononukleáris sejtekben igazolták a fokozott GR α és GR β expressziót [513]. A kortizolt termelő szövetekben igazolt magasabb receptor expresszió hátterében a magasabb ligand koncentráció feltételezhető. A GR promoterében kimutatott GRE hely biztosíthatja a GR expresszió emelkedését glükokortikoid hormonok hatására [514]. Másik lehetséges oka a receptor overexpressziónak a mellékvesekéregben jelen lévő bidirekcionális kapcsolat az immunsejtek és a mellékvesekéreg sejtek között [515]. Cushing szindrómát okozó mellékvesekéreg daganatokban emelkedett IL-1 és IL-1R expressziót igazoltak, ami a GR expressziót is növelheti [516]. Végül egyidőben a mi munkákkal Tacon és mtsai. kimutatták malignus mellékvesekéreg daganatokban a fokozott GR expressziót, de ők nem tettek különbséget az izoformák között, munkájukban egy a receptor N-terminális végére specifikus antitestet használtak [517].

Összegezve eredményeinket megállapítottuk, hogy a GR izoformái expresszálódnak a mellékvesekéregben és a mellékvesekéreg adenómákban, legnagyobb mennyiségben a kortizolt termelő adenómákban. A GR α és a GR β izoforma jelentős emelkedése ezekben a szövetekben egy, a mellékvesekéregben jelenlévő autoregulációra utal, amelynek esetleg szerepe lehet egy helyi, glükokortikoidok iránti rezisztencia mechanizmus kialakulásában.

V.2.5. A mellékvesekéregben működő perifériás óra és a GR izoformák szerepe ennek modulálásában

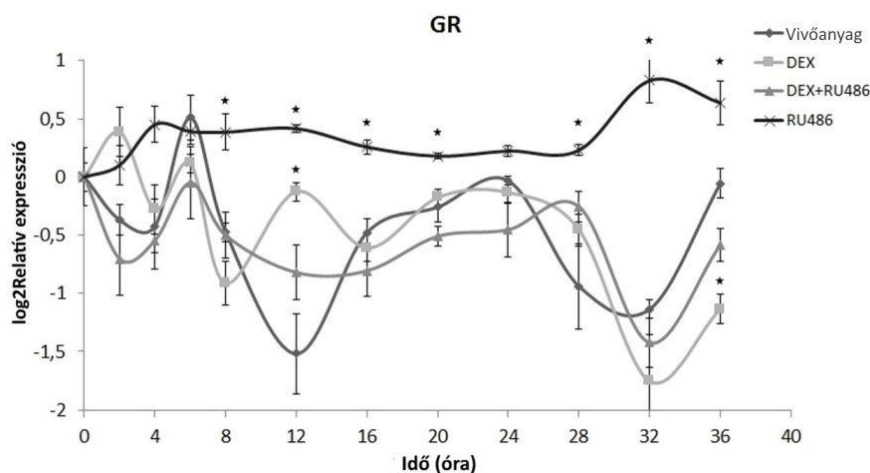
Mivel a mellékvesekéreg hormonok esszenciális szerepet játszanak a napszaki ritmus szabályozásban és a GR expresszálódik a mellékvesekéregben felmerült, hogy a GR szerepet játszhat a perifériás óragének szabályozásában. qRT-PCR-el igazoltuk, hogy az óragének expresszálódnak a mellékvesekéregben és ritmusos ingadozást mutatnak.

A H295R mellékvese sejteket szérumsokk alkalmazásával szinkronizáltuk, majd a cosinor analízist követően 4 óragén (*PER1*, *PER2*, *REV-ERB α* és *ARNTL*) ritmikus expresszióját igazoltuk. A szérumsokk alkalmazását követően a *CRY1* expresszió indukálódott, azonban nem mutatott ritmikus oszcillációt (36. ábra). Az óragének expressziós mintázata megfelelt az irodalomban is ismert szabályozó mechanizmusoknak, azaz a *PER1* és *PER2* gének expressziós mintázata hasonló volt, míg a *REV-ERB α* és *ARNTL* gének ellentétes fázisban oszcilláltak.



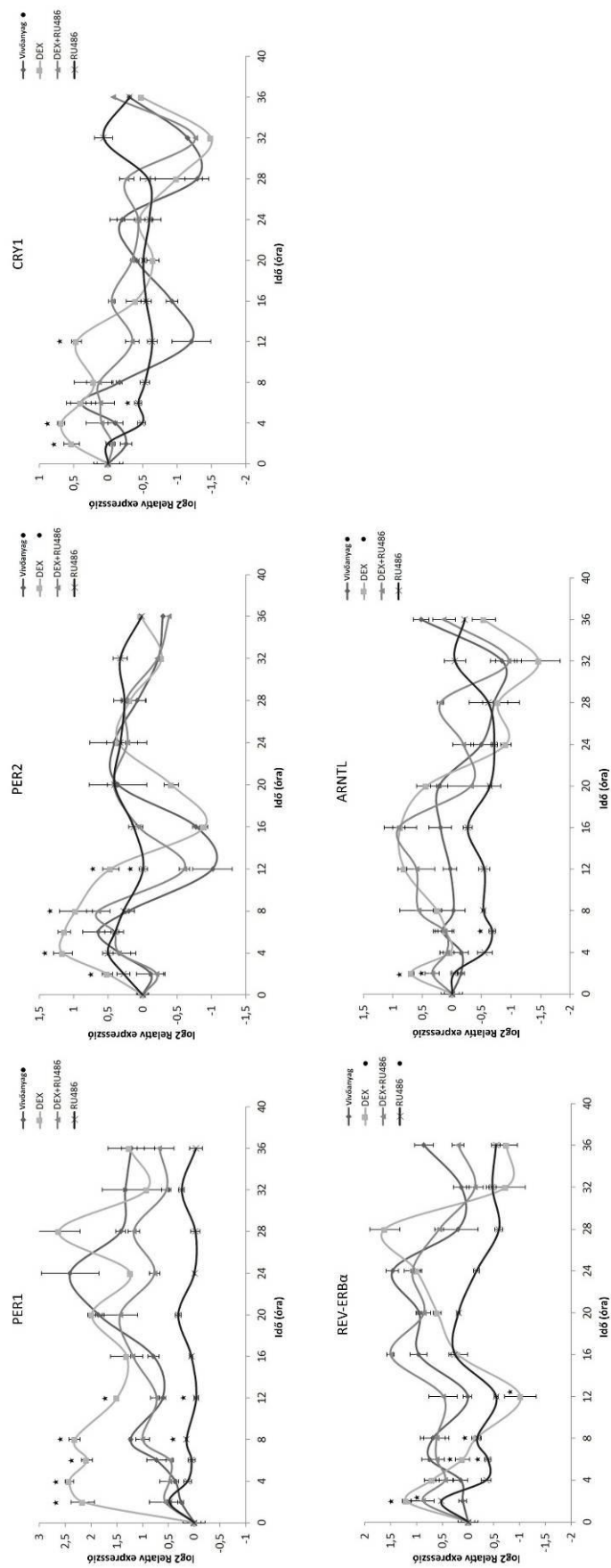
36. ábra A perifériás cirkadián óra szérumsokk alkalmazásával indukálható H295R mellékvesekéreg sejtvonalban. A 0 órás időpont jelzi a szérumsokk végét. A génexpressziót a 0 órás mintához képest tüntettem fel. Az 5 vizsgált óragén közül cosinor analízis a *PER1*, *PER2*, *REV-ERB α* és *ARNTL* gének ritmikus oszcillációját erősítette meg. Az ábrán az átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettem fel.

Érdekes módon a teljes *GR* expresszió, a cosinor analízis alapján ritmikus mintázatot mutatott a kontroll csoportban, ami eltűnt DEX, RU486 vagy a két szer kombinált kezelése során. DEX hatására a teljes *GR* expresszió 12 óra elteltével ideiglenesen indukálódott, míg 36 óra elteltével csökkent a kontroll csoporthoz képest. Ezzel ellenkezőleg a nem specifikus *GR* antagonistá RU486 kezelés a kontrollhoz képes fokozta a *GR* transzkripciót és megszüntette a ritmikus expressziót (**37. ábra**).



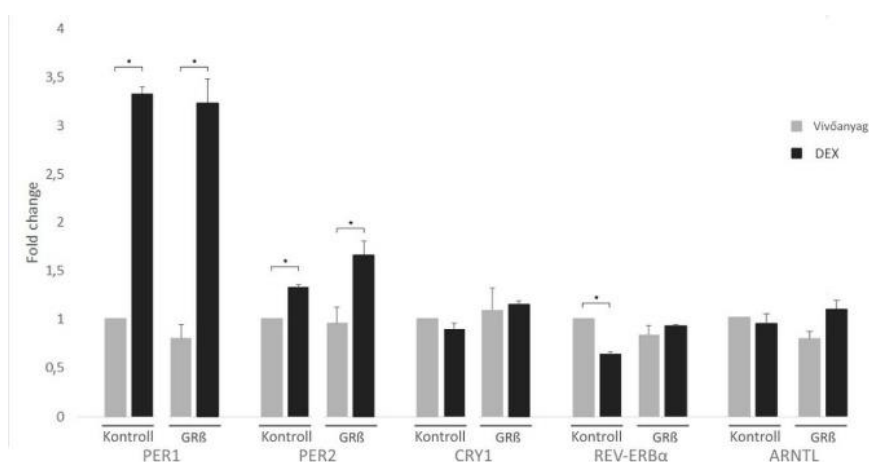
37. ábra A teljes *GR* gén expressziós változásai H295R sejtekben. H295R sejteket 24 órán keresztül szérumban éheztetést követően, majd aktív szén átszűrte Nu-szérumban tartalmazó tápfolyadékba helyezést követően vivőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-zal, 100nmol DEX-zal és 1µmol RU486-tal vagy 1µmol RU486-tal kezeltük. A 0 órás időpontban kezdtem meg a farmakológiai kezeléseket. A vivőanyaggal kezelt csoportban a cosinor vizsgálat ritmikus expressziót igazolt, míg a kezelések megszüntették a ritmust. A relatív expressziót a 0 órás mintához viszonyítva számítottam. A csillaggal jelölt pontokban a génexpresszió szignifikánsan különbözik az adott időpontban a vivőanyaggal kezelt csoporttól. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az ábrán az átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettem fel.

Azoknak az óragéneknek az expressziója, amelyek a $GR\alpha$ közvetlen célpontjai, már a $GR\alpha$ aktivációt követő rövid időn belül megváltozik. Vizsgálataink során ezért a DEX, DEX+RU486 és RU486 kezeléseket követő első 12 óra transzkripciós változásait elemeztük. 2 órás DEX kezelést követően az általunk vizsgált összes óragén ideiglenesen indukálódott, azonban az egyidejű RU486 kezelés alapján csak a *PER1*, *PER2* és *CRY1* gének változtak $GR\alpha$ -dependens módon. A *PER1* és *PER2* expresszió a DEX kezelést követő 12 órán keresztül folyamatosan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest (kivéve a *PER2* esetében 6 óránál), ugyanakkor az egyidejű RU486 kezelés kivédte a DEX hatását. A DEX kezelést követő 4 és 12 órás időpontokban a *CRY1* expresszió magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, melyet az egyidejű RU486 kezelés kivédett. DEX kezelés gátolta a *REV-ERBa* expressziót 6 és 12 óra között, ugyanakkor ezt a hatást az egyidejű RU486 kezelés megelőzte. Az *ARNTL* expresszió nem mutatott szignifikáns változást a $GR\alpha$ stimulációt követő 12 órán belül (**38. ábra**).



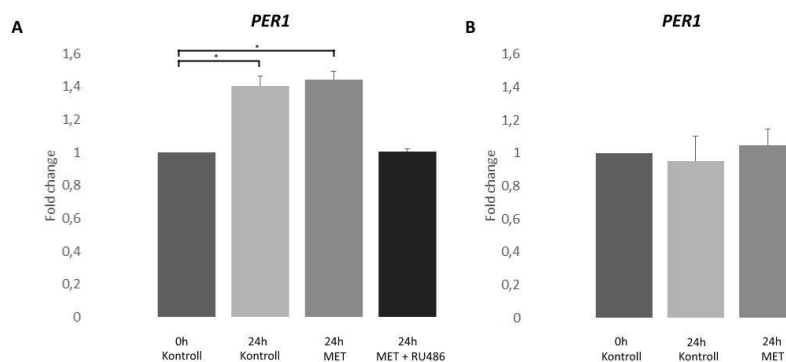
38. ábra Az óragének expressziója GR α agonista és antagonistá kezelést követően H295R sejtekben. H295R sejteket 24 órán keresztül szérum éheztettem, majd aktív szén szűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékba helyeztem és vivőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-nal, 100nmol DEX+1 μ mol RU486-tal vagy 1 μ mol RU486-tal kezeltem. A 0 órás időpontban kezdtem el a kezeléseket. A relatív expressziót a 0 órás vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest számítottam. A cosinor analízis alapján ritmikus expressziót körök jelzik. Csillaggal jelöltem a vivőanyaggal kezelt csoporthoz viszonyítva szignifikáns génexpressziós eltéréseket az első 12 órában. A $p < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak. Az ábrán az átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettem fel.

Krónikusan emelkedett glükokortikoid szintek mellett gyakran fokozott a GR β expresszió, ezért munkánk során megvizsgáltuk a GR β hatását az óragének expressziójára is. Alap helyzetben a H295R sejtekben a GR β mRNS expresszió mind RNS mind fehérje szinten a detekálás közelében volt. Munkánkban a H295R sejteket GR β -t expresszáló vagy üres plazmiddal transzfektáltuk, majd Dexametazonnal vagy vivőanyaggal kezeltük. A GR β túltermelés önmagában nem befolyásolta a vizsgált óragének expresszióját. DEX hatására szignifikánsan emelkedett a *PER1* és *PER2* gének transzkripciója, míg csökkent a *REV-ERB α* gén transzkripciója az üres vektorral transzfektált sejtekben. A GR β túltermelés kivédte a GR α aktivációt követő *REV-ERB α* szuppressziót, ugyanakkor nem befolyásolta a *PER1* és *PER2* gének GR α aktivációt követő indukcióját (**39. ábra**).



39. ábra H295R sejteket üres (kontroll) vagy GR β overexpresszáló plazmiddal transzfektáltuk, majd 6 órán keresztül vivőanyaggal (0,01% etanol) vagy 100nmol DEX-nal kezeltem. A FC-t a vivőanyag kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva számoltam. Az ábrán az átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettük fel. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Vizsgálataink felvetették, hogy a H295R sejtek által termelt szteroidok elegendőek lehetnek az óragének ritmikus expressziójának indukálásához. Ennek igazolására a szérum éheztetést követően 100 μ M metyrapon hozzáadásával meggátoltuk a H295R sejtek endogén kortizol és tesztoszteron szintézisét. A felülúszóból folyadék kromatográfia tandem tömegspektrometriával határoztuk meg a kortizol, progeszteron és tesztoszteron koncentrációkat [518]. Metyrapon kezelést követően a kortizol és tesztoszteron szint a kimutathatósági határ alá csökkent, míg a progeszteron szint érdemben nem változott. A progeszteron génexpresszió szabályozó hatása azonban valószínűtlen, mivel a kontroll és kezelt sejtek esetében is a koncentráció a kimutathatósági határon volt (nem feltüntetett adatok). A hormonszintézis gátlása ellenére a *PER1* expresszió továbbra is indukálódott, ezért a kísérleteket megismételtük és a metyrapon mellett RU486-ot is adtunk a sejtekhez, mely sikeresen kivédte a *PER1* indukcióját (**40. ábra A**). Ugyanakkor, ha a kísérletek előtt a sejteken nem alkalmaztunk szérum éheztetést, a *PER1* oszcilláció nem volt kimutatható (**40. ábra B**).



40. ábra (A) H295R sejteket 24 órán keresztül szérumban éheztettem, majd aktív szénen átszűrt Nu-szérumban tartalmazó tápfolyadékba helyeztem és vivőanyaggal (0,01% etanol, kontroll), 100µmol metyraponnal (MET) vagy 100µmol MET-tel és 1µmol RU486-tal kezeltem. A 0 óra jelzi a farmakológiai kezelések kezdetét. **(B)** H295R sejteket aktív szén szűrt Nu-szérumban tartalmazó tápfolyadékban tartva vivőanyaggal (0,01% etanol, kontroll), 100µmol metyraponnal (MET) kezeltem. A 0 óra jelzi a farmakológiai kezelések kezdetét. Az FC-t a 0 órás kontroll csoporthoz viszonyítva számítottam. Az ábrán az átlag±SEM értékeket tüntettem fel. A $p < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak.

A glükokortikoidok számos szövettípusban képesek szinkronizálni a cirkadián órát, azonban a pontos szabályozó mechanizmus nem teljesen ismert. Perifériás Cushing-betegségben a szteroidok szintézise a HPA tengelytől függetlenül történik és a kortizol szekréció napi ritmusa megszűnik [519,520]. A központi szabályozás hiányának következtében a mellékvese daganatokban autonóm regulációs mechanizmusok léphetnek életbe [520]. Saját vizsgálataim bebizonyították, hogy kortizolt termelő mellékvesekéreg adenómákban mind a $GR\alpha$ mind pedig a $GR\beta$ is erősebben expresszálódik mint egyéb mellékvesekéreg daganatban, így nem zárható ki az intraadrenális glükokortikoid feedback mechanizmus, amit tovább erősítenek [521] Asser és munkatársainak eredményei, melyek szerint a GR autokrin pozitív módon szabályozza a kortizol termelést H295R sejtekben. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a glükokortikoidok a H295R mellékvesekéreg sejtvonal cirkadián órájának szabályozásában is részt vehetnek hasonlóan más szövetekhez [522–524]. Kísérleteink igazolták a GR ritmikus expresszióját, amit a glükokortikoid agonista DEX, valamint a nem specifikus $GR\alpha$, androgén receptor (AR) és progeszteron receptor (PR) antagonisták RU486 kezelés megszüntetett. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a farmakológiai kezelések során megfigyelt ideiglenes GR expressziós változások feltehetően a cirkadián óra manipulációjának következményei. Fontos ugyanakkor megjegyeznünk, hogy a GR poszttranszkripcionális módon is szabályozódhat, többek között az mRNS stabilitás befolyásolásán keresztül, illetve a ubiquitin-proteasóma útvonalon keresztül történő fehérje lebontás által [221,222,525].

Tovább vizsgálva GR és az óragének közötti potenciális kapcsolatát megállapítottuk, hogy szérumban való megvonást követően az aktív szénen átszűrt Nu-szérumban tartalmazó tápfolyadékban tartott

H295R sejtekben (kontroll csoport) a *PER1*, *PER2*, *CRY1* és *ARNTL* óragének ritmikus expressziót mutattak, amit az RU486 - hasonlóan a GR ritmikus expressziójához - meggátolt. Mivel más sejtvonalakban kimutatták, hogy a glükokortikoidok, valamint a tesztoszteron és progeszteron szabályozhatják az óragének működését [526,527], ezért felvetettük, hogy a H295R sejtek endogén szteroid termelése elegendő lehet az óragének indukciójához. Az endogén szteroid szintézis blokkolásával elvégzett kísérleteink azonban nem igazolták feltételezésünket, így az óragének oszcillációja valószínűleg a szérumban éheztetés alkalmazásával lehet kapcsolatban. A szérumban éheztetés, a tápanyag megvonáson keresztül megállítja a sejtciklust a G0/G1 fázisban, és az elmúlt évek kutatásai alapján kölcsönhatás állhat fenn a sejtciklus és a cirkadián óra között [528]. Elképzelhető továbbá az is, hogy a szérumban éheztetés érzékenyebbé változtatta a sejteket a tápoldatban található egyes exogén faktorokkal vagy olyan endogén hormonokkal szemben (a kortizolon, a tesztoszteronon vagy progeszteronon kívül), melyek a GR-on, AR-on vagy PR-on keresztül hatnak. A tápfolyadék összetevői közül az inzulinról és a hemről is ismert, hogy *in vitro* vagy *in vivo* szabályozhatják az óragének transzkripcióját [529–531]. A hemről kimutatták, hogy a REV-ERB α természetes ligandja és fokozza receptor represszor aktivitását [530]. A REV-ERB α a saját promoterének gátlásán keresztül képes szabályozni a saját transzkripcióját [532], így mindez megmagyarázhatja REV-ERB α ritmikus expresszióját RU486 kezelést követően.

Vizsgálataink során *CRH* vagy *POMC* expressziót nem sikerült kimutatnunk a H295R sejtekben, ami együtt azokkal a megfigyelésekkel, hogy hipofízis eltávolításon átesett állatokban az óragének cirkadián oszcillációja változatlan maradt megkérdőjelezi az ACTH kizárólagos szerepét az óragének expressziójának szabályozásában [533,534].

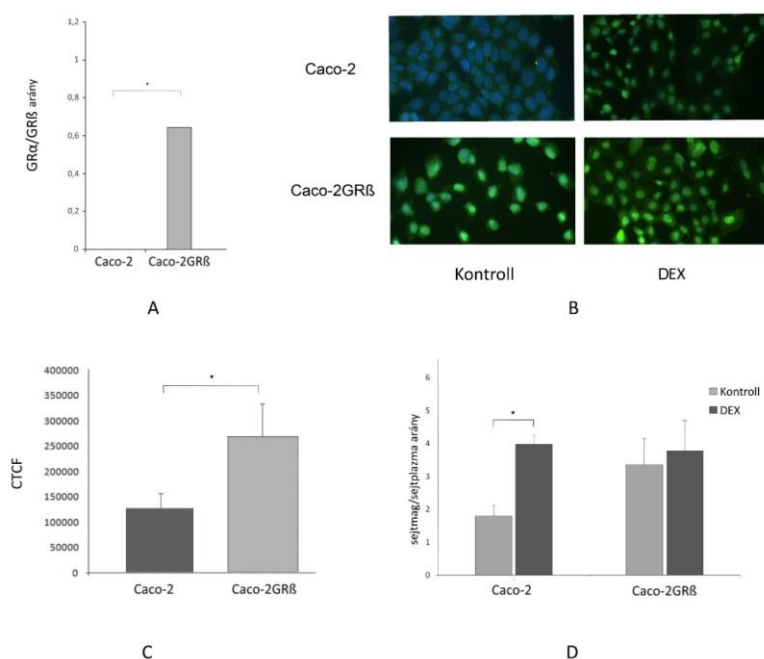
Mindezek alapján eredményeink igazolták, hogy a H295R sejtekben intakt perifériás óra működik, amelyet a glükokortikoidok befolyásolnak. A GR β fokozott expressziója egyedül a REV-ERB α expresszióra van hatással.

V.2.6. A GR β izoforma szerepe a géntranszkripcióban

A GR β hatásának tisztázására létrehoztunk egy sejtvonalat, ami fokozott mértékben expresszálja ezt az izoformát. Génexpressziós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a GR β domináns negatív hatással bír a GR α által szabályozott génekre, de olyan gének transzkripcióját is befolyásolta, ami a GR α -tól független volt. Sejtvonalunk eredetileg egy bélhámsejt volt, így lehetőségünk volt arra, hogy elemezzük azt, hogy a GR β által regulált géneknek milyen szerepe van a gyulladásos bélbetegségekben. Integratív adatelemzést végeztünk a gyulladásos bélbetegségben szenvedőkből elérhető génexpressziós adatokkal, és ezeket összevetettük a GR β által szabályozott génlistákkal. A közös halmazban olyan gének voltak, amelyeknek a sejtadhézióban, a sejt-sejt interakcióban van szerepük. A génexpressziós array-ek adatait egyedi qRT-PCR-el validáltuk. Mindezek alapján a

glükokortikoidok iránti rezisztencia a GR β emelkedett expressziója révén is szerepet játszhat a gyulladásos bélbetegségben igazolt mechanizmusok kialakulásában.

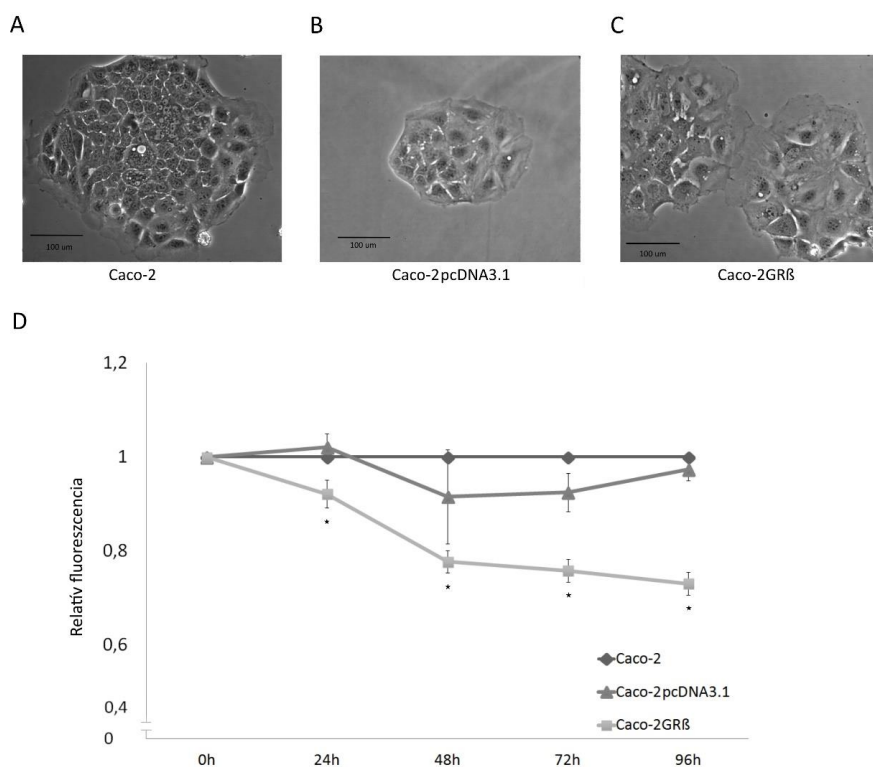
Caco-2 sejtekben a GR β izoforma igen kis mennyiségben expresszálódik. GR β -t termelő plazmiddal történt stabil transzfekciót követően a Caco-2GR β sejtekben a GR β mRNS szint közel százszorosára növekedett a Caco-2 sejtekhez képest (GR α /GR β arány 1:0,6 és 1:0,001). **(41. ábra A)** Immuncitokémiával történt festést követően a sejten belül a GR β fehérje elsősorban a sejtmagon belül helyezkedett el, de a sejtplazmában is kimutatható volt. Az mRNS szinteknek megfelelően Caco-2GR β sejtekben a GR β fehérje is intenzívebben expresszálódott Caco-2 sejtekhez képest (CTCF; átlag $\pm$ SD 269596 $\pm$ 64000 vs 127304 $\pm$ 28640) **(41. ábra B és C)**. DEX kezelés hatására Caco-2 sejtekben szignifikánsan fokozódott a GR β sejtmagi elhelyezkedése (magi/plazma arány 1,79 $\pm$ 0,33-ról 3,9 $\pm$ 0,8 p <0,001), Caco-2GR β sejtekben a DEX kezelés bár tovább növelte a GR β sejtmagi lokalizációját, a hatás nem bizonyult szignifikánsnak (3,3 $\pm$ 0,78-ról 3,78 $\pm$ 0,92 p =0,07).



41. ábra (A) GR α /GR β mRNS aránya Caco-2 és Caco-2GR β sejtekben. A vizsgált géneket 18S háztartási génre normalizáltam, majd az ábrán a GR α /GR β arányt tüntettük fel. * p <0,05 **(B) A GR β fehérje immuncitokémiával történő kimutatása Caco-2 és Caco-2GR β sejtekben.** A sejteket 4 órán keresztül vivőanyaggal (Kontroll) vagy 100nmol dexamethasonnal (DEX) kezeltük **(C) A GR β fehérje kvantitatív analízise.** A korrigált teljes sejt fluoreszcencia (CTCF) számítása legalább 25 sejtből történt. * p <0,05 **(D) A GR β fehérje sejtmag/sejtplazma arány kvantitatív analízise.** A sejteket 4 órán keresztül vivőanyaggal (Kontroll) vagy 100nmol dexamethasonnal (DEX) kezelttem. * p <0,05

A GR β fokozott termelésének hatására a sejtek alakja is megváltozott. Annak érdekében, hogy kizárjuk az üres plazmid hatását Caco-2 sejteken, Caco-2GR β és üres vektorral transzfektált Caco-2 sejteket is megvizsgáltuk. Mikroszkópos képeken Caco-2GR β sejtek mérete nagyobb volt, a

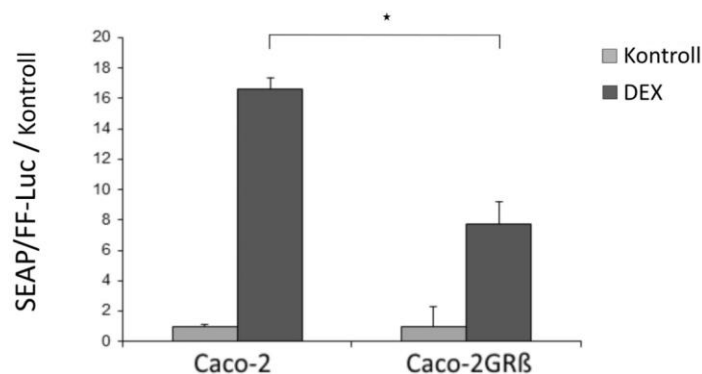
sejtszélek egyenetlenek és szakadozottak és a plazmában több vakuólum látszódott (**42. ábra A-C**), mint az alap sejtekben. Érdekes módon a GR β izoforma túltermelése a sejtek proliferációs képességét is megváltoztatta. Proliferációs assay-vel kimutattuk, hogy a Caco-2GR β sejtek szignifikánsan lassabban szaporodtak, mind az alap Caco-2 sejthez, mind az üres vektorral transzfektált Caco-2pcDNA3.1 sejtekhez képest (**42. ábra D**).



42. ábra 20X nagyítással készült mikroszkópos felvételek a **(A)** Caco-2, **(B)** az üres vektorral transzfektált Caco-2pcDNA3.1 és **(C)** GR β overexpresszáló vektorral transzfektált Caco-2GR β sejtvonalakról. **(D)** A Caco-2, Caco-2pcDNA3.1 és Caco-2GR β sejtvonalak proliferációs vizsgálata. A kapott eredményeket a Caco-2 sejtvonalhoz viszonyítva ábrázoltam. Az átlag $\pm$ SEM számítása legalább 7 párhuzamos mintából történt. *p<0,05

Caco-2 és Caco-2GR β sejtvonalakon GR α agonista DEX kezelés előtt és után is teljes genom mircoarray vizsgálatot végeztünk. Caco-2 sejtekben a DEX kezelés 116 gén expresszióját változtatta meg (47 gén alul- és 69 gén felülexpresszálódott), míg Caco-2GR β sejtekben mindössze 12 gén expressziója változott (5 gén alul- és 7 gén felülexpresszálódott)

A GR β túltermelés mindezek alapján a sejtvonalat érzéketlenné változtatta a glükokortikoidokkal szemben. A GR β szteroid-érzékenységet befolyásoló hatásának további vizsgálatára a sejtvonalakat GRE-SEAP riporter vektorral transzfektáltuk, és a GR α agonista DEX kezelést követően a GR β izoformát fokozottan termelő sejtekben DEX hatására szignifikánsan alacsonyabb mértékben növekedett a SEAP aktivitás a kontroll csoporthoz képest (**43. ábra**). Eredményeink megerősítik, hogy a GR β izoforma fokozott termelődése csökkenti a glükokortikoidok GRE-n keresztül történő transzkripció aktivitását.



43. ábra A GRE-SEAP aktivitás vizsgálata Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonalon. A sejteket 100nmol DEX-nal kezeltük, majd a mért SEAP aktivitást a transzfekciós kontrollként használt firefly luciferáz értékekre normalizáltuk. Eredményeinket a vivőanyaggal kezelt Caco-2 sejtekhez viszonyítva ábrázoltuk. Az átlag±SEM számítása legalább 3 párhuzamos minta 6x ismételt méréséből történt. * $p < 0,05$

A Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonalak microarray vizsgálatának eredményeit összehasonlítva a GRβ túltermelés következtében 852 gén expressziója változott meg (196 alul- és 656 felülexpresszáldott). Érdekes módon a GRβ overexpressziója számos olyan gén transzkripcióját is befolyásolta, amely Caco-2 sejtekben DEX kezelést követően nem változott. Mindössze 67 olyan gént azonosítottunk, amely mind a GRβ túltermelés, mind a DEX kezelés hatására megváltozott; ezek közül 23 gén mindkét esetben felülexpresszáldott, míg 44 gén transzkripciója ellentétes irányban változott.

A microarray vizsgálat eredményei alapján a Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonala között eltérően expresszáldó gének közül többet is sikeresen validáltunk TaqMan Génexpressziós Kártyák segítségével. A GRβ túltermelés következtében felülexpresszáldó gének között azonosítottam az apoptózis szabályozásában (*BCL2*, *CASP1*), a metabolizmusban (*CPE*, *NNMT*, *LARGE*, *PAH*, *SLC26A9*), az immun és gyulladásos válaszban (*IL1RAP*, *SAMD9*, *DEFB1*), a szignáltranszdukcióban (*RHOBTB1*, *RICH2*, *TGFB2*), a transzkripció vagy RNS érés szabályozásában (*RBMS3*, *SATB1*) és a sejtmátrix kialakításában (*VIM*, *CDH6*, *SPP1*, *SPARC*, *COL4A6*) szerepet játszó géneket. Az alulexpresszáldó gének között az immunválaszban (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*), transzkripcióban (*NFIA*, *RPL39L*), metabolizmusban (*PDE4A*) és a jelátviteli utakban (*SAMD1*, *S100P*, *SSTR1*) szerepet játszó géneket azonosítottunk. (34. táblázat)

34. táblázat Microarray vizsgálat alapján Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonalak között eltérően expresszáldó gének validálása. A GRβ szabályozás alatt álló és az IBD-vel kapcsolatba hozható géneket félkövér betűtípussal jelöltem. Minden esetben $p < 0,05$.

Gén szimbólum	Gén	Irány	Fold change	
			Array	qRT-PCR

Felül expresszált gének n=34				
<i>PTN</i>	pleiotrophin	↑	133,43	118,60
<i>GABRA2</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2	↑	41,89	52,71
<i>LARGE</i>	like-glycosyltransferase	↑	21,50	27,67
<i>SATB1</i>	SATB homeobox 1	↑	33,02	27,67
<i>RBMS3</i>	RNA binding motif, single stranded interacting protein	↑	30,84	21,26
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1	↑	15,16	15,24
<i>CRABP2</i>	cellular retinoic acid binding protein 2	↑	12,90	13,93
<i>TRPV6</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6	↑	22,08	11,55
<i>VIM</i>	vimentin	↑	17,24	9,99
<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9	↑	25,84	9,78
<i>NNMT</i>	nicotinamide N-methyltransferase	↑	33,56	7,11
<i>FBXO25</i>	F-box protein 25	↑	12,47	6,73
<i>PSG9</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	↑	15,09	5,21
<i>SLC26A9</i>	solute carrier family 26, member 9	↑	18,81	4,63
<i>NAV3</i>	neuron navigator 3	↑	4,73	4,38
<i>CASP1</i>	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	↑	19,79	4,26
<i>PSG8</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8	↑	13,38	4,23
<i>CDH6</i>	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	↑	16,79	3,89
<i>PAH</i>	phenylalanine hydroxylase	↑	18,63	3,84
<i>FAM65B</i>	family with sequence similarity 65, member B	↑	27,05	3,73
<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis-related 1	↑	5,70	3,63
<i>COL4A6</i>	collagen, type IV, alpha 6	↑	3,54	3,48
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	↑	4,96	3,41
<i>RICH2</i>	Rho-type GTPase-activating protein RICH2	↑	20,97	3,34
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor, beta 2	↑	4,50	3,34
<i>RHOBTB1</i>	Rho-related BTB domain containing 1	↑	14,92	3,18
<i>DEFB1</i>	defensin, beta 1	↑	5,50	2,57
<i>SNX10</i>	sorting nexin 10	↑	3,04	2,06
<i>S100P</i>	S100 calcium binding protein P	↑	3,58	2,51
<i>CPE</i>	carboxypeptidase E	↑	19,19	2,00
<i>TNS4</i>	tensin 4	↑	5,00	1,88
<i>CHI3L1</i>	Chitinase-3-like2	↑	2,71	1,88
<i>SORL1</i>	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	↑	2,55	1,69
<i>SPARC</i>	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	↑	3,86	1,64
<i>IL1RAP</i>	interleukin 1 receptor accessory protein	↑	2,77	1,49
Alul expresszált gének n=14				
<i>TMEM176A</i>	transmembrane protein 176A	↓	28,72	26615,89
<i>RPL39L</i>	ribosomal protein L39-like	↓	16,63	652,58
<i>TMEM176B</i>	transmembrane protein 176B	↓	26,17	501,46
<i>ECHDC2</i>	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2	↓	17,43	238,86
<i>NID2</i>	nidogen 2 (osteonidogen)	↓	26,74	30,91

<i>POMC</i>	proopiomelanocortin	↓	5,26	26,17
<i>PDE4A</i>	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific	↓	10,20	20,53
<i>NFIA</i>	nuclear factor I/A	↓	8,22	9,32
<i>CXCL1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	↓	8,84	8,28
<i>SSTR1</i>	somatostatin receptor 1	↓	5,15	6,63
<i>SMAD1</i>	SMAD family member 1	↓	4,59	6,15
<i>FABP5</i>	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	↓	10,28	1,65
<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	↓	2,56	1,40
<i>CXCL3</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	↓	3,09	1,32

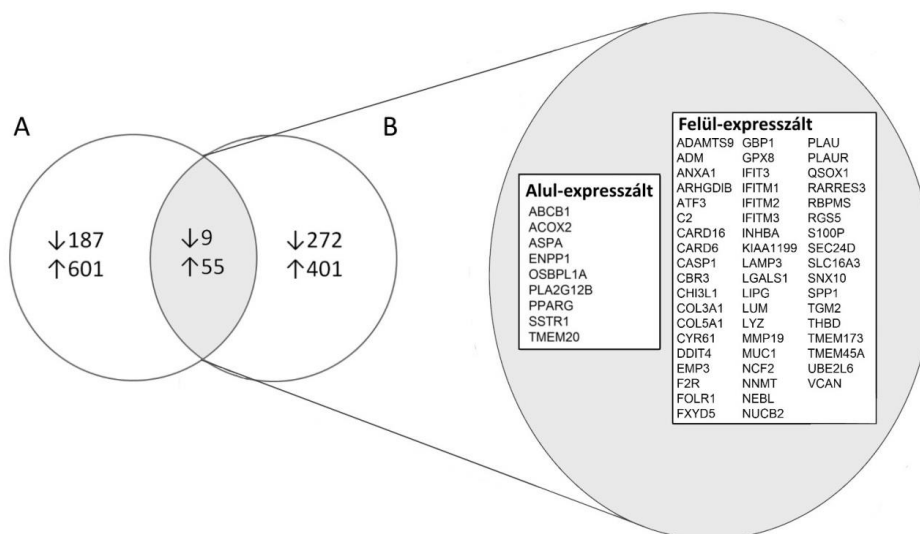
Eredményeink ezen részét összegezve levonhatjuk azt a következtetést, hogy a létrehozott Caco2-GR β sejtvonal alkalmas a glükokortikoid rezisztencia vizsgálatára. A megnövekedett GR β transzkripció gátolta a GR α funkciót és a glükokortikoidokkal szemben érzéketlenné változtatta a Caco-2 bélhám sejteket. A GR β általi transzkripció gátlás mechanizmusára több mechanizmus is felmerült: i) a GR β gátolhatja a GR α -t kompetitív módon a GRE kötőhelyeken keresztül, ii) funkcionálisan inaktív GR α -GR β heterodimerek jöhetnek létre, és iii) elképzelhető a két izoforma a GR koaktivátorokért történő versengése is [142,184,535].

Munkánk kiegészíti a korábbi Hela és U2OS oszteoszarkóma sejtvonalakon végzett microarray kísérleteket, amelyek már jelezték, hogy a GR β -nak GR α független transzkripciós hatása is lehet. A GR β nem képes glükokortikoid-kötésre és a GRE-t tartalmazó promoterek indukciójára sem. Mindazonáltal a GR β az ép DBD és AF1 doméneken keresztül feltételezhetően képes önállóan interakcióba lépni más fehérjékkel és a DNS-sel. Saját eredményeink is alátámasztják a GR β önálló transzkripciós szerepét, mivel GR β túltermelés hatására számos olyan gén expressziója változott meg, amelyek DEX kezelésre nem reagálnak.

A létrehozott sejtmódel klinikai alkalmazhatóságára elvégeztük az IBD-ben elérhető microarray adatok metaanalízisét és ezeket összevetettük a Caco-2GR β sejtből kimutatott transzkripcióhatásokkal.

Az IBD-ben eltérően expresszálódó gének meta-analízise során 8 különböző tanulmány összesen 245 microarray vizsgálatának adatait elemeztük. A kiválasztott tanulmányokban a teljes genom microarray vizsgálatokat IBD-ben (Crohn betegségben vagy colitis ulcerosában) szenvedő betegek és egészséges emberek vastagbél nyálkahártyából vett biopsziás mintáiból végezték. Vizsgálatunkban a Crohn betegek és egészségesek mintáinak összehasonlítása után 737, míg colitis ulcerosa és az egészségesek között 838 eltérően expresszálódó gént találtunk. Ezt követően az egészségesek és a Crohn betegek között, valamint a Caco-2 és Caco-2GR β sejtvonalak között eltérően expresszálódó gének összehasonlításával összesen 64 azonos irányban változó gént (55 felülexpresszálódó és 9 alulexpresszálódó) sikerült azonosítanunk (44. ábra). 28 olyan gént is találtunk, amely az összehasonlításban ellentétes irányban változott. Ugyanezt az összehasonlítást

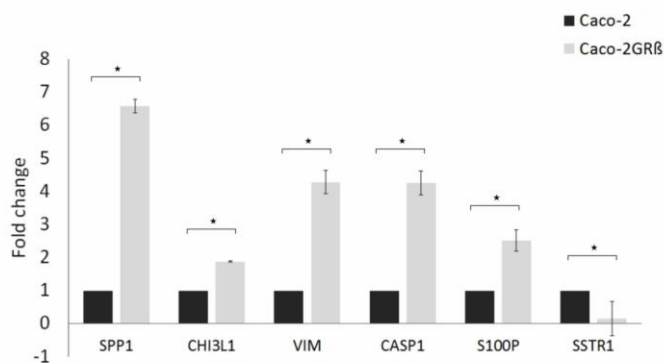
colitis ulcerosában szenvedő betegek microarray adataival is elvégeztük, de a közösen változó géneket tekintve nem találtam érdemi eltérést a Crohn betegekből talált eltérésekhez képest.



44. ábra A Caco-2GR β sejtekben a Caco-2 sejtekhez képest (A) és a Crohn betegségben az egészséges bélszövethez képest (B) eltérően expresszáldó gének Venn diagramja. Az átfedést mutató gének listáját kinagyítva ábrázoltam.

A Caco2-GR β sejtekben és Crohn betegségben közösen változó gének funkcionális analízise alapján a „sejt-sejt jelátvitel és interakció”, a „sejtmozgás” valamint a „sejt növekedés és proliferáció” kategóriákon belül elsősorban a tumorsejtek adhéziója, a sejtmigráció és a sejtproliferáció folyamatai érintettek.

A GR β által szabályozott sejtheadhézióban, sejtmigrációban és sejtproliferációban szerepet játszó gének közül 6-ot (*SPP1*, *CHI3L1*, *VIM*, *CASP1*, *S100P* és *SSTR1*) egyedi TaqMan assay-ek használatával qRT-PCR-rel validáltam. Ezek megerősítették a microarray vizsgálat során kapott eredményeket, azaz a Caco-2GR β sejtekben szignifikánsan magasabb volt az *SPP1*, *CHI3L1*, *VIM*, *CASP1* és *S100P* expressziója, míg az *SSTR1* expresszió alacsonyabb volt az alap Caco-2 sejtekhez képest (45. ábra).



45. ábra A GR β overexpresszió hatására megváltozott, a sejtadhézióban és sejt migrációban szerepet játszó gének egyedi validálása qRT-PCR-rel. Caco2GR β sejtvonalban a Caco-2 sejtekhez képest az *SSP1*, *CHI3L1*, *VIM*, *CASP1* és *S100P* szignifikánsan indukálódott, míg az *SSTR1* szignifikánsan gátlódott. Az átlag $\pm$ SD számítása 3 párhuzamos biológiai mintából történt. A Fold change értékét a Caco-2 sejtekhez viszonyítva ábrázoltam. * $p < 0,05$.

Vizsgálatunk során a Caco-2 sejtekben GR β fokozott expressziójának transzkripciós hatásait összehasonlítottuk az IBD vastagbél biopsziás mintákban azonosított génexpressziós eltérésekkel. Eredményeik alapján az IBD-ben eltérően expresszáldó gének közel 10%-a GR β túltermelés hatására is megváltozott, többnyire azonos irányba. Ezek a gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyeknek szerepe elsősorban a sejtadhézióban, a sejtproliferációban és a sejt migrációban van. A génexpressziós mérések után több gént egyedi qRT-PCR-e és egyedileg összeállított TaqMan kártyák segítségével is sikeresen validáltunk. A GR β fokozott expresszió Hela és U2OS sejtekben is a sejt-adhézióban és sejt-extracelluláris mátrix (sejt-ECM) interakcióban részt vevő gének kifejeződését szabályozta [189]. Ezeknek a fehérjéknek az elsődleges szerepe a bél nyálkahártya védelme. A GR β túltermelés hatására megváltozott ECM alkotók közül, például a kollagén (*COL3A1*), galectin-1 (*LGALS*), oszteopontin (*SPP1*), oszteonektin (*SPARC*) és vimentin (*VIM*) géneknek jól ismert szerepük van a fibrózis, nyálkahártya regeneráció és bakteriális invázió folyamataiban kísérletes IBD-ben [536–539]. A megváltozott sejtregeneráció, sejtadhézió és ECM összetétel összefüggésbe hozható az IBD kialakulásával, így eredményeink a GR β expresszió eddig ismeretlen szerepét vetik fel a bélhám szövetben. Néhány az IBD-vel kapcsolatba hozott gén expressziója, (például a sejt adhéziós molekula *PECAM1*, kemokinek (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*) és az antimikrobiális védekezésben szerepet játszó *DEFB1*) GR β túltermelés hatására ellentétesen változott, mint IBD-ben. Ennek magyarázata lehet, hogy az IBD-s bélszövet mintákban több sejt típus is (pl. immun és stróma sejtek) megtalálható, illetve az immunhisztokémiai festés során nemcsak a bélhámsejtek, hanem fibroblasztok, limfociták és mononukleáris sejtek is GR β pozitivitást mutattak [201]. Mivel az eddigi ismeretek tükrében a GR β sejt-specifikus módon képes szabályozni a génexpressziót, ezért a különböző sejt típusokban a fokozott GR β expresszió hatásai igen összetettek lehetnek IBD-ben. A jövőben állatkísérletek segíthetnek tisztázni a bélhám szövetben fokozott GR β expresszió szerepét az IBD-ben.

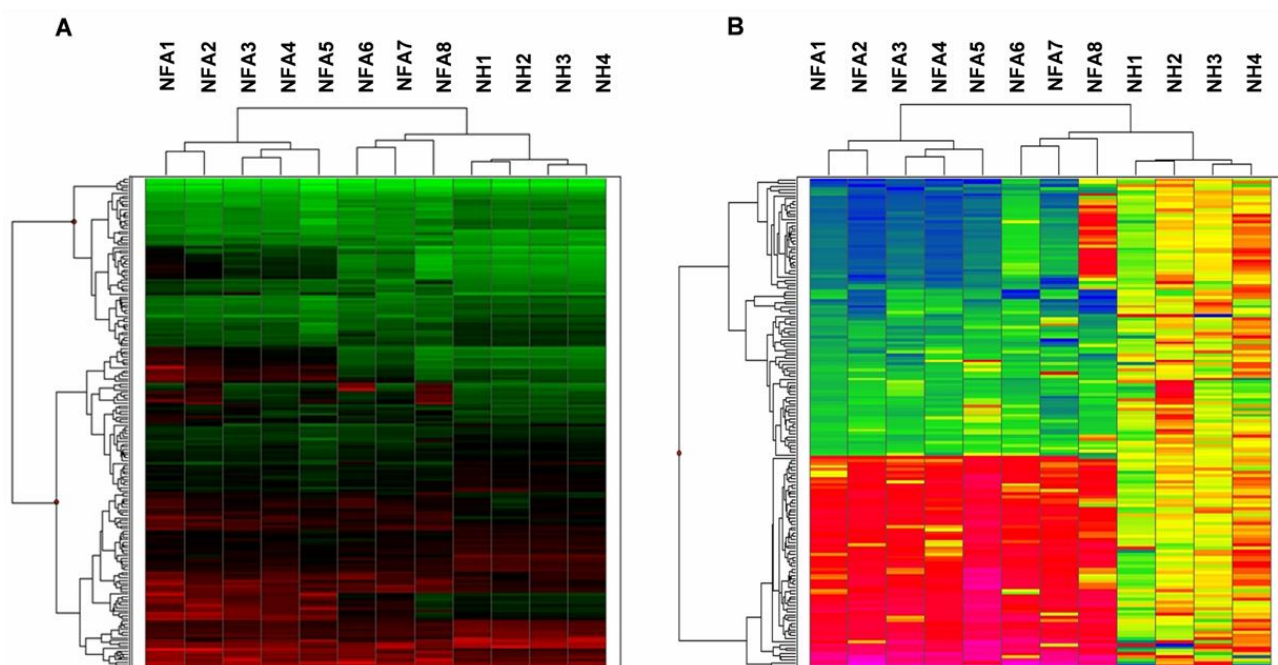
VI.2.7. A hipofízis daganatok mikro-RNS expressziós mintázata

Hipofízis szövetekben a teljes genomot lefedő mikro-RNS-expressziós profil vizsgálatával olyan mikro-RNS-eket azonosítottunk, amelyek vizsgálata segítheti a daganat-típusok sokszor szövettani vizsgálattal sem egyszerű azonosítását. Megállapítottuk, hogy a nem-funkcionáló

hipofízis adenomák (NFA) szövetre általánosságban fokozott, míg a GHA és a GHPA szövetekre inkább csökkent globális mikro-RNS expresszió jellemző.

Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy az NFA daganatok heterogenitása miatt számos jelátviteli út vagy ugyanazon út, de különböző szabályozási szinteken lehet érintett. E daganatok heterogenitását mind a patológiai, mind a korábbi génexpressziós és mikro-RNS-expressziós vizsgálatok is alátámasztják [278,415].

Következő kísérletünkben 12 hipofízis szövet (8 NFA és 4 NH) egyedi expressziós profilját határoztuk meg preamplifikációval kiegészített TaqMan Low Density Array segítségével. Öt mikroRNS (miR-198, miR-299-5p, miR-497*, miR-548c-3p, miR-622) csak a normális hipofízisben, míg 3 mikroRNS (miR-124*, miR-515-5p, miR-872) csak a NFA mintákban volt jelen kimutatható mennyiségben. A mindkét csoportban expresszáldó 478 mikro-RNS közül az NFA mintákban 92 mikro-RNS legalább kétszeresre növekedett, 70 mikro-RNS pedig legalább felére csökkent expressziót mutatott a normális hipofízis szövetéhez viszonyítva. Hierarchikus cluster analízissel a daganatos és az ép szövetminták egymás mellé rendeződtek. A szignifikánsan túlrepresszált mikro-RNS-ekkel a DIANA-mirPath szoftver segítségével **útvonalelemzése** 63 jelátviteli útvonalat azonosított, amelyek közül a sejtciklus és a TGF β útvonalak elemzését részletesen is elvégeztük (**46. ábra**).



46. ábra. NFA és normális hipofízis (NH) szövetben szignifikánsan eltérően expresszáldó mikro-RNS-ek; **A:** dCt értékek, **B:** normalizált, ddCt értékek hierarchikus cluster analízise [540]

VI.2.8. TGF β útvonal mikro-RNS-ek általi szabályozása hipofízis daganatokban

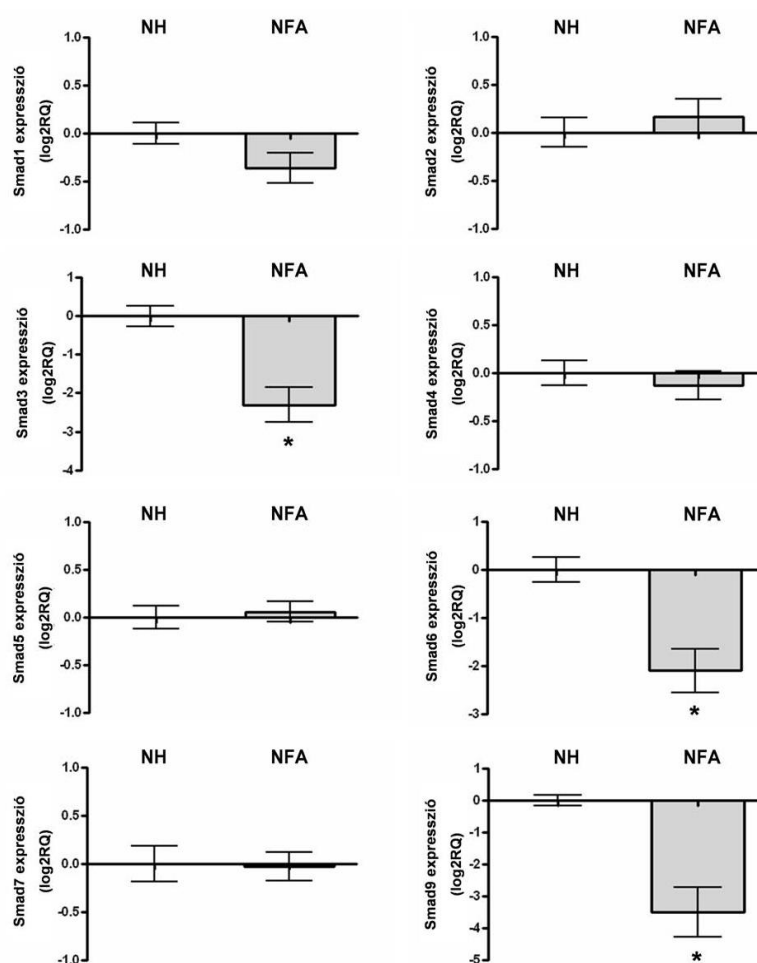
A legjelentősebbnek tűnő jelátviteli utak között szerepel a TGF β jelátviteli útvonal 205 mikro-RNS-mRNS interakcióval 51 gén és 39 mikro-RNS között. A 39 mikro-RNS-ből 19 mikro-RNS önmagában is szignifikáns hatással bírhat a TGF β útvonalra (35. táblázat).

35. táblázat. TGF β útvonalat befolyásoló mikro-RNS-ek

mikro-RNS	Célgének száma	-ln(p)	Gén
miR-582-3p	6	22,87	SMAD2, CREBBP, THBS2, PPP2CA, ACVR2B, BMPR2
miR-519c-3p	13	16,78	BMP6, ZFYVE9, SMAD7, LEFTY1, SMAD5, ACVR1, MAPK1, LEFTY2, TGFB2, ACVR1C, ZFYVE16, BMPR2, SMAD4
miR-429	14	14,47	RHOA, SMURF1, SMAD2, ACVR2A, NOG, PPP2R2C, CREBBP, PPP2CA, ACVR2B, SMURF2, SP1, ACVR1C, EP300, RPS6KB1
miR-93	15	14,14	E2F5, RBL2, SMURF1, ZFYVE9, SMAD7, SMAD6, RBL1, SMAD5, MAPK1, PPP2CA, BMP2, ACVR1B, TGFB2, ZFYVE16, BMPR2
miR-301a	13	13,98	TGFB1, TNF, ZFYVE9, SMAD5, ACVR1, INHBB, MAPK1, TGFB2, BMPR1B, SP1, ACVR1C, BMPR2, SMAD4
miR-301b	13	13,98	TGFB1, TNF, ZFYVE9, SMAD5, ACVR1, INHBB, MAPK1, TGFB2, BMPR1B, SP1, ACVR1C, BMPR2, SMAD4
miR-454	13	13,98	TGFB1, TNF, ZFYVE9, SMAD5, ACVR1, INHBB, MAPK1, TGFB2, BMPR1B, SP1, ACVR1C, BMPR2, SMAD4
miR-153	10	12,97	ROCK1, SMURF1, ZFYVE9, ACVR2A, INHBB, CREBBP, ACVR1B, TGFB2, BMPR2, RPS6KB1
miR-545	10	11,36	RBL2, TGFB1, BMP6, SMAD7, SMAD5, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, SMAD4, SMAD3
miR-592	4	8,15	ACVR2A, ACVR2B, SP1, SMAD4
miR-373	8	7,28	E2F5, SMAD2, RBL1, LEFTY1, INHBB, LEFTY2, TGFB2, BMPR2
miR-378	3	6,78	BMP8B, MAPK1, BMP2
miR-652	1	6,77	ACVR2B
miR-628-5p	4	6,42	ACVR1, MAPK1, ACVR2B, BMPR2
miR-570	8	5,94	TNF, SMAD2, SMAD5, ACVR1, CREBBP, PPP2CA, BMPR2, SMAD4
miR-769-5p	3	5,68	TGFB1, SMAD2, BMPR2
mikro-RNS	Célgének száma	-ln(p)	Gén
miR-140-5p	5	4,81	TGFB1, SMURF1, MAPK1, BMP2, PITX2
miR-641	5	3,81	TGFB1, SMURF1, ACVR2B, SP1, RPS6KB1
miR-875-5p	2	3,5	ACVR2A, TGFB3
miR-548b-3p	3	2,83	SMAD7, PPP2R1B, SP1
miR-183	4	2,4	PPP2CA, ACVR2B, PPP2CB, SMAD4
miR-208b	2	2,24	TGFB1, PPP2R2C
miR-582-5p	5	2,17	CDKN2B, ID4, ACVR2B, ACVR1B, BMPR1B
miR-491-3p	3	2,08	ID3, SMAD2, ACVR2A
miR-182	7	1,71	ROCK1, SMAD7, ACVR1, GDF6, THBS2, SMAD1, BMPR1B
miR-140-3p	3	1,3	RHOA, MAPK1, ACVR2B
miR-96	6	1,17	E2F5, SMAD7, ACVR1, THBS2, ACVR2B, BMPR1B
miR-149	3	1,04	ID4, SMAD2, SP1
miR-636	4	0,98	INHBB, PPP2R2C, TGFB2, SP1
miR-628-3p	1	0,44	RBL2
miR-137	5	0,41	SMURF1, ACVR1, SP1, ACVR1C, ZFYVE16
miR-139-5p	2	0,41	THBS1, PPP2CA
miR-33b	1	0,35	SMAD7

miR-501-5p	1	0,24	PITX2
miR-532-3p	1	0,21	GDF6
miR-501-3p	1	0,19	PPP2R2C
miR-362-5p	1	0,1	SP1
miR-330-5p	1	0	ACVRL1
miR-532-5p	1	0	SMAD2

Validálás során a TGF β jelátvitel vizsgálatához 10 normális és 10 NFA szöveten qRT-PCR-rel meghatároztuk a nyolc ismert Smad molekula (Smad1-9) expresszióját, amelyekről feltételeztük, hogy funkciózavaraik szerepet játszanak a daganat kialakulás folyamatában. Kimutattuk, hogy a Smad3, Smad6 és Smad9 expressziója hipofízis adenoma mintákban szignifikánsan csökkent az ép szövethez képest (**47. ábra**). A Smad3 a TGF β jelet közvetíti, a Smad6 és Smad7 pedig gátolja mind a TGF β , mind a BMP útvonalak jelátvitelét. Bár a Smad6 expressziója NFA mintákban szignifikánsan csökkent, a Smad7 szintje nem változott. A BMP jelet közvetítő Smad molekulák közül a Smad1 és Smad5 expressziójában nem igazoltunk különbséget, míg a Smad9 szignifikánsan csökkent expressziót mutatott a daganatokban az ép szövethez képest.



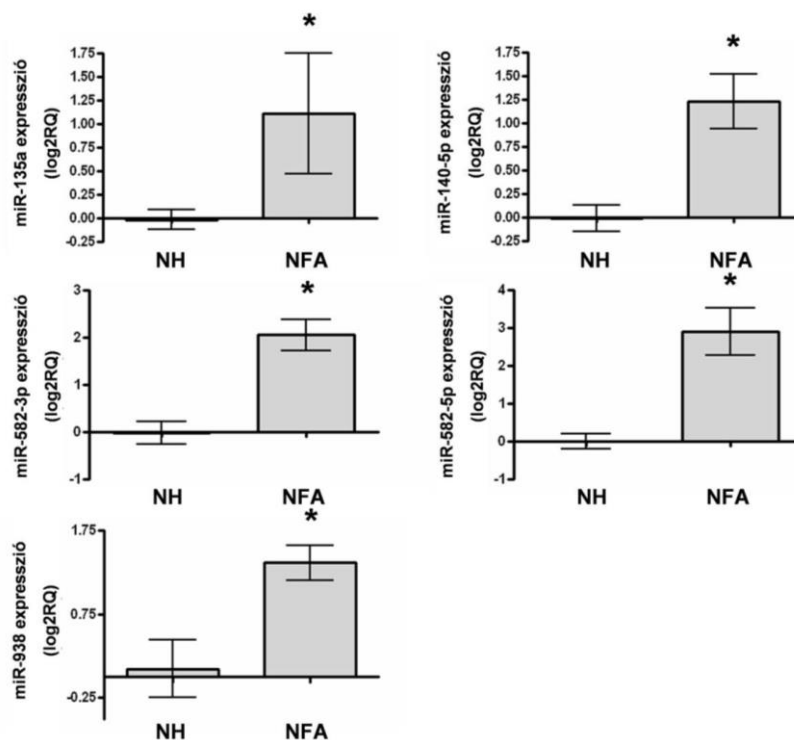
47. ábra. A *Smad* család mRNS expressziós profilja hypophysis szövetekben
(log2RQ = -ddCt; *: $p < 0.05$; NH: ép hipofízis; NFA: nem funkcionáló hipofízis adenoma) [540]

A Smad3 és mikro-RNS-ek közötti expresszió lehetséges kapcsolatának vizsgálatában a TLDA eredmények értékelése során 74 mikro-RNS expressziója mutatott szignifikáns korrelációt a Smad3 expresszióval, és ezek közül 30 mikro-RNS expressziója a daganatos és normális hipofízis szövetekben eltérő volt. Öt különböző target predikciós programmal a Smad3 esetében ez a szám 20-ra szűkült (19 fokozott és egy csökkent expressziót mutató mikro-RNS), amelyek expressziója negatívan korrelált a Smad3 expresszióval (**36. táblázat**). A PicTar program nem azonosított be egyetlen egy mikro-RNS-Smad3 interakciót sem. Ezek közül a miR-140 és a Smad3 mRNS közötti interakciót riportergén vizsgálattal már korábban bizonyították. Mindezen eredmények alapján megállapítható, hogy a mikro-RNS-ek által közvetített poszttranszkripció szabályozás nagy valószínűséggel befolyásolja a TGF β jelátviteli útvonal tagjainak expresszióját, amelyeknek szerepe lehet nemcsak a hipofízis daganatok kialakulásában, hanem a normális hipofízis szövet működésében is.

36. táblázat. A *Smad3* 3'UTR-t potenciálisan célzó mikro-RNS-ek expressziója hipofízis adenomákban. *: kísérletesen igazolt target

Túlexpresszált mikro-RNS-ek és Smad3 közötti interakció				mikro-RNS	Smad3 – mikro-RNS korreláció		mikro-RNS expresszió	
DIANA-mirPath	TargetScan	microRNA.org	MicroCosm		R(x,y)	p-value	-ddCT	p value
			+	hsa-miR-93*	-0,811	0,001	0,54	0,048
+				hsa-miR-491-3p	-0,808	0,001	1,10	0,005
	+			hsa-miR-135a	-0,747	0,005	0,82	0,025
+	+			hsa-miR-545	-0,728	0,007	1,40	0,035
		+		hsa-miR-582-5p	-0,720	0,008	7,33	0,004
	+			hsa-miR-500	-0,706	0,010	1,68	0,016
	+			hsa-miR-153	-0,700	0,011	2,33	0,000
	+			hsa-miR-501-3p	-0,684	0,014	1,94	0,038
+	+	+		hsa-miR-570	-0,676	0,016	1,73	0,000
	+			hsa-miR-501-5p	-0,671	0,017	2,12	0,004
+				hsa-miR-582-3p	-0,671	0,017	4,97	0,004
	+			hsa-miR-200b	-0,657	0,020	0,83	0,045
	+			hsa-miR-641	-0,636	0,026	2,31	0,004
	+			hsa-miR-579	-0,631	0,028	0,92	0,018
+	+			hsa-miR-429	-0,623	0,030	1,61	0,001
	+			hsa-miR-362-5p	-0,609	0,035	1,75	0,036
	+	+		hsa-miR-938	-0,609	0,036	2,90	0,000
		+		hsa-miR-140-5p	-0,608	0,036	1,49	0,011
	+			hsa-miR-139-5p	-0,579	0,049	2,37	0,013

Ezeknek az eredményeknek a megerősítése céljából 10 NFA és 10 ép mintában 5 mikro-RNS egyedi TaqMan assay-történt mérése is igazolta a fokozott expressziót az NFA mintákban a normális hipofízis szövetekhez képest (**48. ábra**) [540].



48. ábra. TLDA eredmények validálásához kiválasztott Smad3-t célzó 5 mikro-RNS expressziója hipofízis szövetekben (*: $p < 0,05$; *: $p < 0,05$; NH: ép hipofízis; NFA: nem funkcionáló hipofízis adenoma) [540].

Ezek az eredmények további adatokat szolgáltatottak arról, hogy a TGF β útvonalnak a hipofízis daganatok kialakulásában központi szerepe lehet. Interakciós partnere a meninnek és a familiáris hipofízis adenomák kialakulásával is sz összefüggésbe hozták.

A TGF β jelátvitel fontos szerepet játszik a fejlődésben és a daganatok kialakulásában. A TGF β tumorszuppresszor és onkogén funkciót egyaránt betölthet. A daganatképződés korai fázisában a TGF β a p53-mal közösen tumorszuppresszorként gátolja a sejtproliferációt, de a TGF β által aktiválódott Smad molekulák mutáns p53-mal nem invazív tumorsejtekben pro-invazív hatást fejtenek ki és elősegítik a daganatos sejtek TGF β hatásra bekövetkező migrációját. Ha ezek az agresszív sejtek elvesztik a mutáns p53 fehérjéjüket, metasztatikus potenciáljuk is elvész [541]. A benignus hipofízis adenomákban a TP53 mutációja kivételesen ritka és inkább a TGF β jelátviteli út tumorszuppresszív hatása érvényesül. Ezt a feltételezést támasztja alá MEN1 szindrómában a menin funkciójának elvesztésekor a daganatok kialakulása, ugyanis a Smad fehérjékkel együtt a menin is kulcsszerepet játszik a TGF β hatás közvetítésében. Ez a tumorszuppresszor hatás nemcsak a sejtosztódás gátlásában, hanem az apoptózis indukcióban is megnyilvánul. A TGF β indukálja a p15^{Ink4b}-t és a p21^{Waf1/Cip1}-et, ezáltal gátolja a ciklin D–CDK4/6 és ciklin E–CDK2 komplexeket

[542,543]. A CDKI-k indukciója mellett gátolja a CDK aktivátor CDC25A-t: egyrészt a p16^{ROCK}-on keresztüli foszforilációval inaktíválja, másrészt közvetlenül génszinten is akadályozza a transzkripciót.

A TGF β /activin család tagjai fontos szerepet játszanak a laktotróp sejtekből származó hipofízis adenomák kialakulásában [544]. NFA-ból származó HP75 sejteken TGF β adásra csökken a sejtproliferáció és fokozódik az apoptózis [545,546]. A TGF β ezen kívül szabályozza a gonadotróp sejtek hormontermelését is. Az activin és TGF β ugyanazon a jelátviteli úton osztozik, activin hatásra a gonadotróp sejtekben fokozódik az FSH termelés [547].

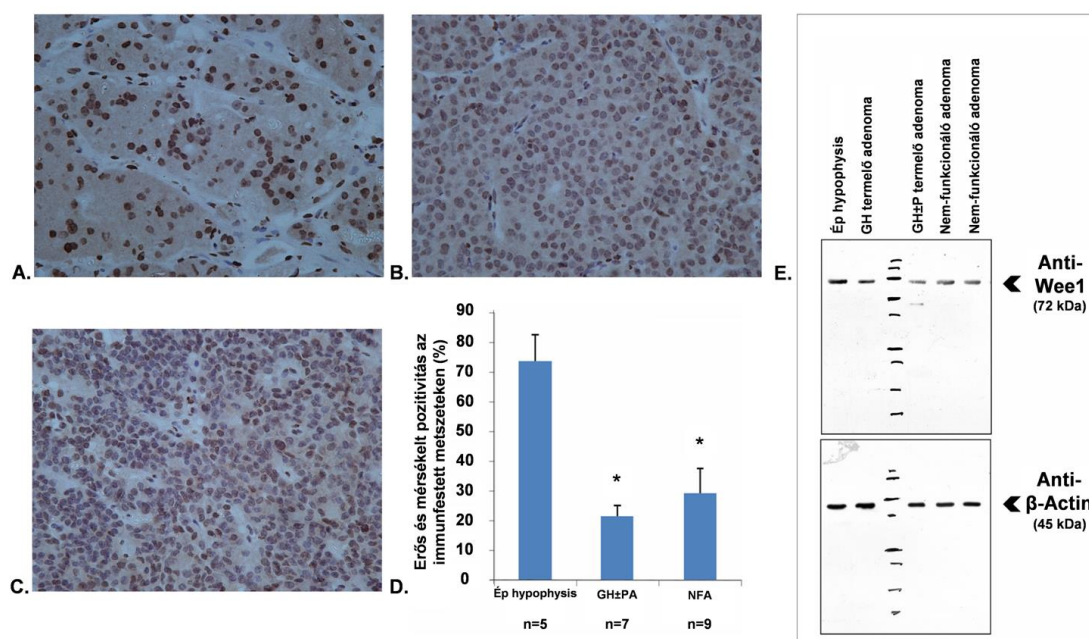
A TGF β receptorok kifejezett expresszióját mutatták ki mind daganatos, mind normális hipofízis szövetben [546], de nem találtak különbséget az NFA és a normális hipofízis minták TGF β receptor expressziója között [548]. A receptorokat kódoló gének mutációja hipofízis adenomákban ritkán fordul elő [549]. Bár a TGF β receptort illetően microarray vizsgálatok nem mutattak különbséget a daganatos és normális hipofízis szövet között, hipofízis adenomákban a TGF β szabályozás alatt álló FSH, LH és TSH-beta alegység [550] csökkent expresszióját észlelték [548], ami a TGF β jelút csökkent aktivitását is jelezheti. A TGF β jelút egyik kulcsfontosságú közvetítője a menin, amelynek mutációja a familiáris adenomákkal ellentétben sporadikus daganatok esetében ritkán fordul elő [551,552].

A TGF β jelátvitel fontos downstream molekulája a Smad3. Bár korábban nem találtak Smad3 mutációt hipofízis és endokrin daganatokban (parathyroid adenoma, enteropancreas endokrin neopláziák) [553], de a tumorsuppresszor meninrel való közvetlen interakció által is szerepet játszhat a hipofízis adenomák patogenezisében. Eredményeink alapján a Smad3 kulcsszerepet játszhat ezekben a daganatokban. Az általunk beazonosított mikro-RNS-ek közül a TGF β jelátvitel poszttranszkripciós szintű szabályozását a miR-106b-25 és a miR-17-92 cluster esetében már korábban bizonyították. A miR-106b, -93, -17-5p, 20a elnyomja a p21^{Waf1/Cip1} expresszióját, ami a TGF β -indukált jelátvitelben a sejtproliferáció gátlását okozhatná, a miR-25 és a miR-92 pedig gátolja a Bim expressziót, amely elengedhetetlen feltétele a TGF β által kiváltott apoptózisnak [554,555]. A miR-93, -17-5p és 20a expresszióját magasabb volt az NFA mintákban a normális szövethez képest, ugyanakkor az NFA sejtek kevesesebb, mint 5%-a expresszál immunfestéssel kimutatható p21^{Waf1/Cip1} fehérjét [317]. Ezt az expresszió-csökkenést mindössze az esetek 3%-ában okozza promóter hipermetiláció [282], ezért fennáll annak a lehetősége, hogy a p21^{Waf1/Cip1} legalább részben mikro-RNS-ek általi szabályozás alatt is állhat.

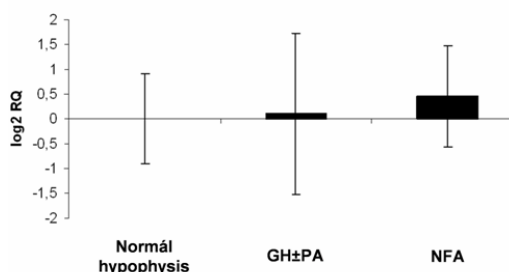
Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy a mikro-RNS-ek által közvetített poszttranszkripciós szabályozás nagy valószínűséggel befolyásolja a TGF β jelátviteli útvonal tagjainak expresszióját, amelyeknek szerepe lehet nemcsak a hipofízis daganatok kialakulásában, hanem a normális hipofízis szövet működésében is [309].

VI.2.9. Emelkedett expressziót mutató mikro-RNS-ek szerepe a WEE1 kináz szabályozásában

A hipofízis adenomákban fokozottan expresszált mikro-RNS-ek lehetséges célpontjai közül a bioinformatikai algoritmusok a sejtciklus kináz WEE1 fehérjét vetette fel. Hipofízis szövetekben a WEE1 expresszióját mRNS és/vagy fehérje szinten elemezve kimutattuk, hogy a WEE1 fehérje mind a hormonálisan inaktív mind pedig a növekedési hormont termelő szövetekben csökkent expressziót mutatott az ép szövethez képest, de mRNS szinten ez nem volt igazolható, ami felvetette a WEE1 poszttranszkripcionális mikro-RNS-ek általi szabályozásának lehetőségét.



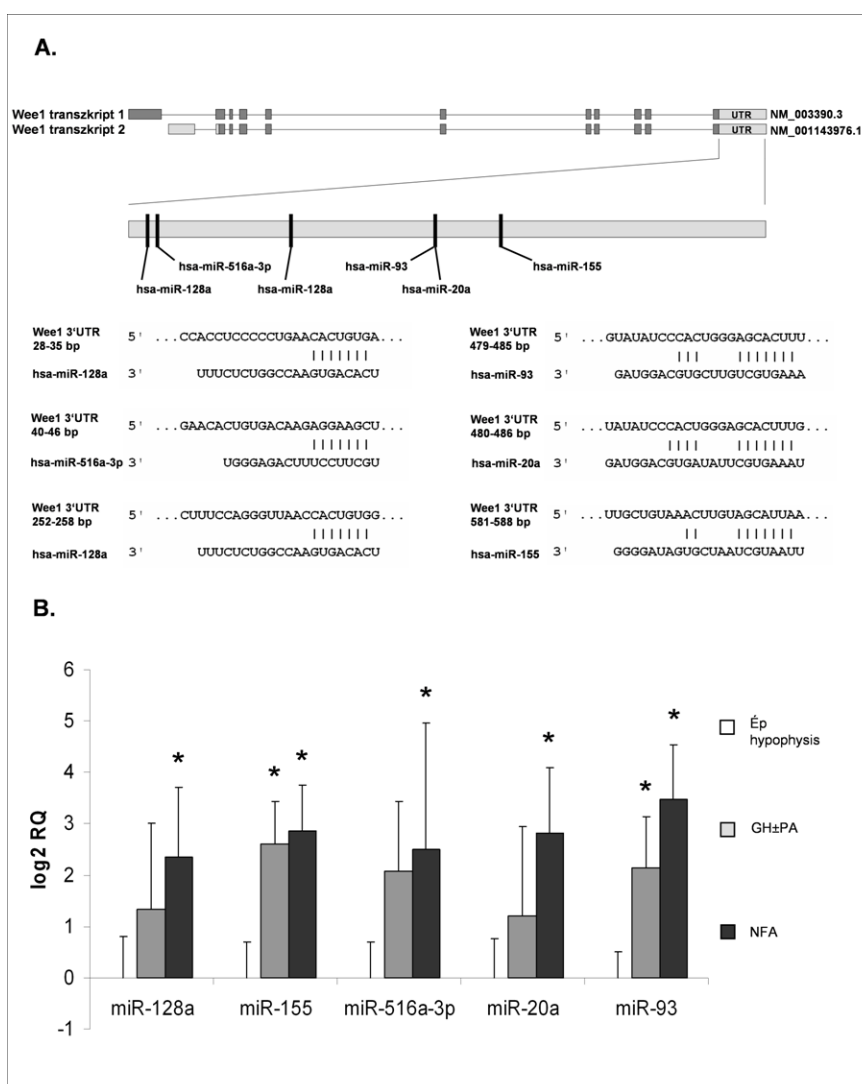
49. ábra. Normális hipofízis (A), GHA (B) és NFA szövetben (C) a WEE1 fehérje immunhisztokémiai vizsgálata. D: A WEE1 immunhisztokémiai vizsgálat eredményeinek mennyiségi értékelése; E: A WEE1-ellenes antitest specifitásának ellenőrzése Western blottal. *p: <0,05 [556].



50. ábra. WEE1 mRNS expressziója qRT-PCR-rel hipofízis szövetekben

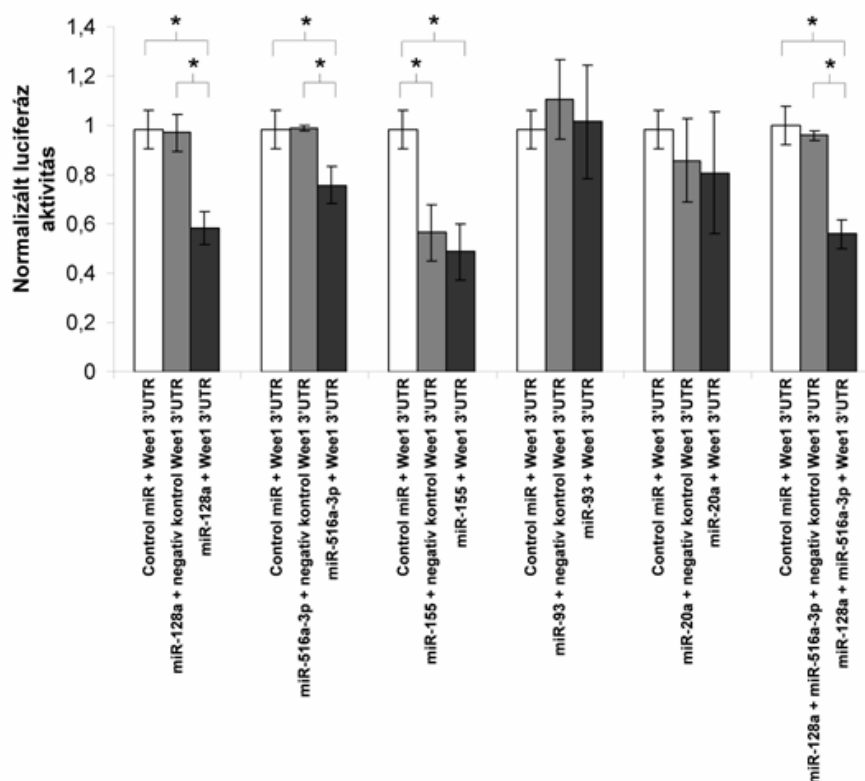
Western blottal a WEE1 immunhisztokémiához hasonló eredményt kaptam, azonban statisztikai értékelés a vizsgált minták kis száma miatt nem volt lehetséges. A fehérjeszinten észlelt eredményektől eltérően a WEE1 mRNS mennyiségi vizsgálata (kvantitatív real-time PCR, qRT-PCR) nem mutatott eltérést a különböző csoportok között (50. ábra), ami alátámasztotta a poszttranszkripcionális szintű szabályozás lehetőségét.

A WEE1-t célzó mikro-RNS-ek azonosítása céljából *in silico* target predikciót, majd az *in silico* kutatásokkal feltárt lehetséges mikro-RNS-ek közül 5 potenciális miR-t (miR-128a, miR-516a-3p, miR-155, miR-20a, miR-93) validáltunk. Kvantitatív real-time PCR módszerrel NFA mintákban mind az öt vizsgált miR expressziója szignifikánsan magasabb volt. A miR-155 és a miR-93 expressziója az NFA mintákon kívül a GH±PA csoportban is szignifikánsan nagyobb volt a normális hipofízis szövetben talált expressziós értékekhez képest (51. ábra).



51. ábra. A: a WEE1 3'UTR-en elhelyezkedő miR-128a, miR-155, miR-516a-3p, miR-20a és miR-93 kötőhelyek lokalizációja. B: a kiválasztott mikro-RNS-ek expressziója (log2RQ: -ddCT) normális hipofízis (n=10), GH±PA (n=7) és NFA (n=18) szövetekben. *: $p < 0,05$ [556].

Az elvégzett riportergén kísérlet *WEE1* alapján a miR-128a, a miR-155 és a miR-516a-3p szignifikánsan csökkentette a luciferáz aktivitást a 3'UTR régiójával való direkt interakció révén.



52. ábra. A vizsgált mikro-RNS-ek hatása a vad típusú vagy negatív kontroll *WEE1* 3'UTR-t tartalmazó plazmidra. *p: <0,05 [556].

A miR-128a és a miR-516a-3p esetében irányított mutagenézissel sikerült bizonyítani a programok által jelzett kötőhelyek működőképességét, míg a miR-155 esetében az alap-plazmiddal való interakció miatt ennek bizonyítása nem volt lehetséges. A három mikro-RNS együttes transzfekciójával a WEE fehérje mennyisége az eredeti mennyiség 18%-ára csökkent. A mikro-RNS-mRNS interakció bizonyítása után a mikro-RNS-ek hatását nemcsak a riportter konstrukcióra, hanem HeLa sejtek endogén *WEE1* fehérje expressziójára is sikerült kimutatni. Mindezek az eredmények igazolják, hogy a fokozott expressziót mutató mikro-RNS-ek célozzák és csökkentik a *WEE1* fehérje expresszióját hipofízis daganatokban, ami a G2/M átmenet rendellenességére utal.

Az előzőekben vizsgált 5 fokozottan expresszált miR hatását a *WEE1* 3'UTR-re riportergén rendszerrel tanulmányoztuk. HeLa sejteket transzfektáltunk vad típusú (pWee+) vagy negatív kontroll *WEE1* 3'UTR-t tartalmazó plazmiddal (pWee-) és 100 nM kontroll vagy specifikus pre-miR prekursor molekulával. Kimutattuk, hogy a miR-128a, a miR-516a-3p és a miR-155 szignifikánsan gátolta a luciferáz aktivitást a kontroll mikro-RNS-ekhez képest ($0,58 \pm 0,06$; $0,75 \pm 0,07$ és $0,48 \pm 0,11$ /átlag $\pm$ SD; $p < 0,01$) a vad típusú szabályozó régió (pWee+), míg

ugyanezeknek a mikro-RNS-eknek nem volt hatásuk a kontroll szabályozó régióra (pWee-). A miR-93-nak és a miR-20a-nak nem volt számottevő hatása a *WEE1* 3'UTR-re (52. ábra).

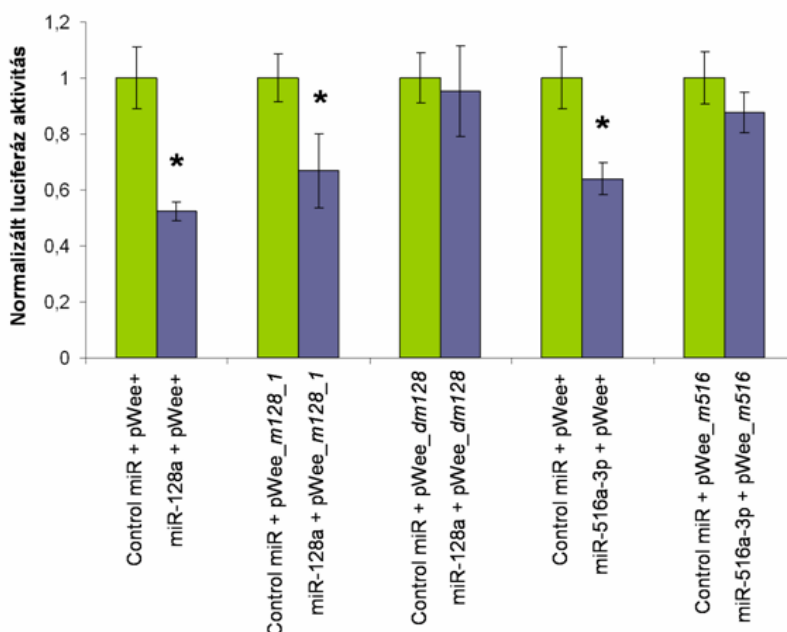
A miR-155 a többi mikro-RNS-től eltérően gátolta a pWee- luciferáz aktivitását is. RNA22 target predikciós szoftverrel az alap plazmid (pGL3) 1131-1153 bp szakaszán egy potenciális miR-155 kötőhelyet azonosítottam, ami magyarázhatja ezt a jelenséget.

A mikro-RNS-ek együttes hatásának vizsgálatához többszörös mikro-RNS transzfekciót is végeztünk. A miR-128a és a miR-516a-3p együttes adása szignifikánsan csökkentette a luciferáz aktivitást a kontroll miR-hez viszonyítva (53. ábra).

A mikro-RNS-ek kötőhelyének pontos azonosításához site-directed mutagenézissel módosítottuk a programok által jelzett helyeket a *WEE1* 3'UTR régióban (54. ábra), majd a mutáns plazmidokat HeLa sejtekbe transzfektálva megvizsgáltuk a mikro-RNS-ek hatását a módosított 3'UTR régiókra.

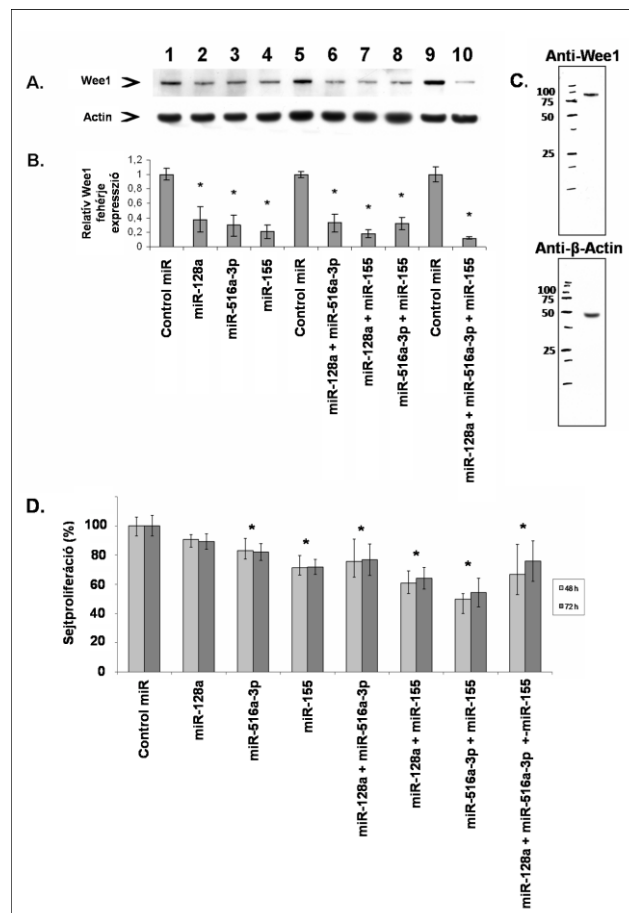
miR-128_1 kötőhelye a Wee1 3'UTR-en (28-34 bp)	5' . . . CCACCUCUUUUUUGAAACACUGUGA . . . 3'
mutált miR-128_1 kötőhely	5' . . . CCACCUCUUUUUUGAACGAATTC . . . 3'
miR-128_2 kötőhelye a Wee1 3'UTR-en (252-258 bp)	5' . . . CUUUCAGGGUUAACACUGUGG . . . 3'
mutált miR-128_2 kötőhely	5' . . . CUUUCAGGGUUAACGAATTCG . . . 3'
miR-516a-3p kötőhelye a Wee1 3'UTR-en (40-46 bp)	5' . . . GAACACUGUGACAAGAGGAAGCU . . . 3'
mutált miR-516a-3p kötőhely	5' . . . GAACACUGUGACAAGGAATTCU . . . 3'

53. ábra. A miR-516a-3p és a miR-128a kötőhelyei mutáns primerekkel irányított mutagenézissel oly módon módosítva, hogy a 7 bázisnyi kötőhelyből (pirossal keretezve) 6 bázist (kék) EcoRI restrikciós enzim hasítóhelyre (GAATTC) cseréltem.



54. ábra. A miR-128a és a miR-516a-3p hatása a vad típusú (pWee+) és mutáns *WEE1* 3'UTR-t tartalmazó plazmidokra (pWee_m128_1; pWee_dm128; pWee_m516). *p: <0,05

Megállapítottuk, hogy míg a miR-128 a vad típusú 3'UTR-en 52%-ra csökkentette a luciferáz aktivitást; az egyik kötőhelyen mutált 3'UTR-en (pWee_m128_1) 67%-ra, a mindkét kötőhelyen mutált 3'UTR-en (pWee_dm128) pedig mindössze 95%-ra. Ezek az eredmények a miR-128a mindkét kötőhelyének működését bizonyítják (28-34 bp és 252-258 bp). A miR-516a-3p hatására a vad típushoz képest szignifikáns, míg a mutáns 3'UTR-en statisztikailag nem szignifikáns aktivitáscsökkenést mutattunk ki, ami igazolja a *WEE1* 3'UTR régióban a miR-516-3p kötőhely aktivitását. Három miR (miR-128a, -516a-3p és -155) hatását transzfekciót követően HeLa sejtenyészetben vizsgáltuk a WEE fehérje expressziójára. 48 órával a transzfekciót követően kimutattuk, hogy három mikro-RNS együttes adása után 12%-ra csökkent a WEE1 fehérje mennyisége, de mindhárom mikro-RNS önmagában is szignifikáns csökkenést eredményezett (55. ábra). (A miR-20a, és -93 transzfekciója nem befolyásolta szignifikáns módon a fehérje mennyiségének csökkenését, megerősítve a riportergén kísérlet eredményeit).



55. ábra. A: 1, 5, 9: Kontroll miR, 2: miR-128a, 3: miR-516a-3p, 4: miR-155, 6: miR-128a + miR-516a-3p, 7: miR-128a + miR-155, 8: 6: miR-516a-3p + miR-155, 10: miR-128a + miR-516a-3p + miR-155 pre-miR-prekurzorral transzfektált HeLa sejtlizátumon végzett reprezentatív Western blot. Minden transzfekciót három párhuzamos kísérletben végeztük el. B: Western blot vizsgálat eredményeinek denzitometriás mennyiségi értékelése β -actin-ra történő normalizálást

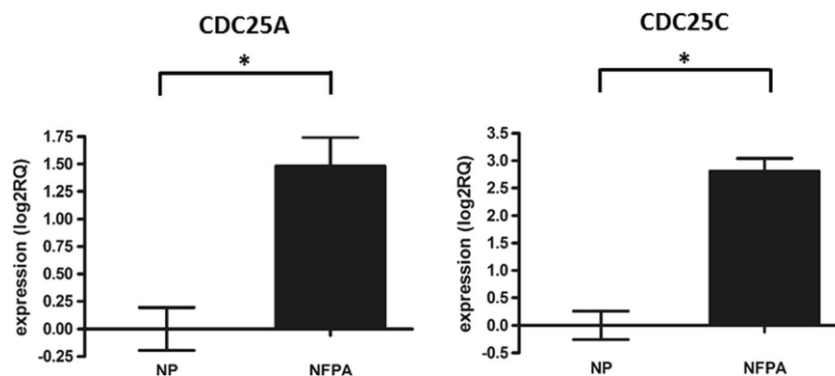
követően. **C:** Az antitest specificitását illusztráló Western blot. **D:** Pre-miR transzfekció hatása HeLa sejtek proliferációjára Alamar Blue Assay segítségével. *p: <0,05. (Butz és mtsai, 2010)

A sejtciklus és szabályozásának zavara genetikai mutációk, vagy epigenetikai eltérések következtében a hormonális rendszer daganataira jellemző és visszatérő jellegzetesség. A G1/S átmenetet szabályozó gátló molekulák (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p21^{WAF1/CIP1}) csökkent expresszióját már kimutatták hipofízis adenomákban (Yoshino és mtsai, 2007, Ogino és mtsai, 2005), de a G2/M átmenet szabályozási zavarai eddig nem kerültek a kutatások előterébe, bár az újabb fehérjearray alapú vizsgálatok felvetették a G2/M átmenetet szabályozó fehérjék lehetséges patogenetikai szerepét. A G2/M ellenőrzési pont a replikáció alatt keletkezett károsodott DNS kiszűrésére hivatott, fő szabályozója a ciklin B-CDK1 komplex. A WEE-szerű kinázok a treonin-14/tirozin-15 foszforilációjával inaktíválják a CDK1-t, míg az ezzel ellentétes hatásért felelős CDC25 foszfatáz aktiváló hatást fejt ki. A WEE1 kinázt mindezek alapján mitotikus inhibitorként írják le [557], amelynek inaktivációja hozzájárul a sejtproliferáció előrehaladásához. A WEE1 fokozott expressziója a sejtciklus G2 fázisban történő leállításához vezet a CDK1 inaktív állapotának fenntartása által. Látszólagos ellentmondásnak tűnhet, hogy a WEE1 inhibitorok mégis hasznosak lehetnek a daganatellenes terápiában [558]. Olyan daganatos sejtekben, amelyekben a p53/Rb útvonal károsodott, a G1/S ellenőrzési pont kiesik, és az egyetlen DNS-javítás céljából fennálló felügyeletet a G2/M ellenőrzési pont biztosítja. Ilyen sejtek DNS-károsító anyagokkal (pl.: fluorouracillal) történő kezelése esetén sokkal nagyobb hatékonyságot lehet elérni, ha kiiktatják a G2/M ellenőrző pontot, ugyanis a daganatos sejtekben mitotikus katasztrófához, apoptózishoz vezető DNS károsodás lép fel, míg az egészséges sejteket (ahol a G1/M átmenet nem károsodott) a kezelés érintetlenül hagyja. A WEE1 inhibitorok tehát ezeket a daganatos sejteket szelektíven érzékenyíthetik a DNS-t károsító kemoterapeutikumok iránt [559].

A hipofízis daganatokban végzett mikro-RNS-re irányuló úttörő munkénk során igazoltuk, hogy mind a teljes, mind a foszforilált WEE1 fehérje mennyisége (de azonos mRNS mellett) csökkent az NFA és GH±PA szövetekben a normális hipofízis szövethez képest, ami felvetette a *WEE1* poszttranszkripcionális, mikro-RNS-ek általi szabályozásának lehetőségét. Az elvégzett kutatások eredményeként sikeresen validáltuk a miR-128a-WEE1, a miR-155-WEE1 és a miR-516a-3p-WEE1 interakciókat riporter rendszerekben és pre-mikro-RNS prekursorokkal történt transzfekciót követően. A későbbi pontban folytatva a G2/M átmenet szisztematikus elemzését a CDC25 és mikro-RNS-ek közötti kapcsolat és ezek hatásairól további eredményeket mutatok be.

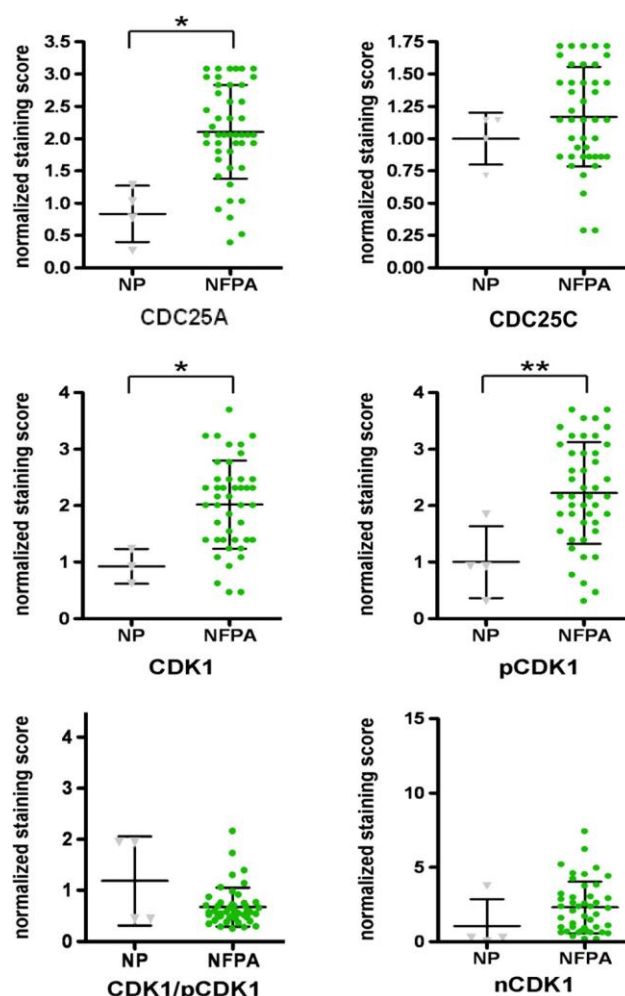
VI.2.10. *A sejtciklus G2/M átmenetében szerepe játszó mikro-RNS-ek szerepe hipofízis daganatokban*

A korábbi eredményeink alapján folytattuk a G2/M átmenet szisztematikus elemzését hipofízis daganatokban. Igazoltuk, hogy a WEE1 fehérjével ellentétes hatást okozó CDC25A és CDC25C fokozott expressziót mutat az NFPA szövetekben az ép hipofízis szövetekhez képest (**56. ábra**).



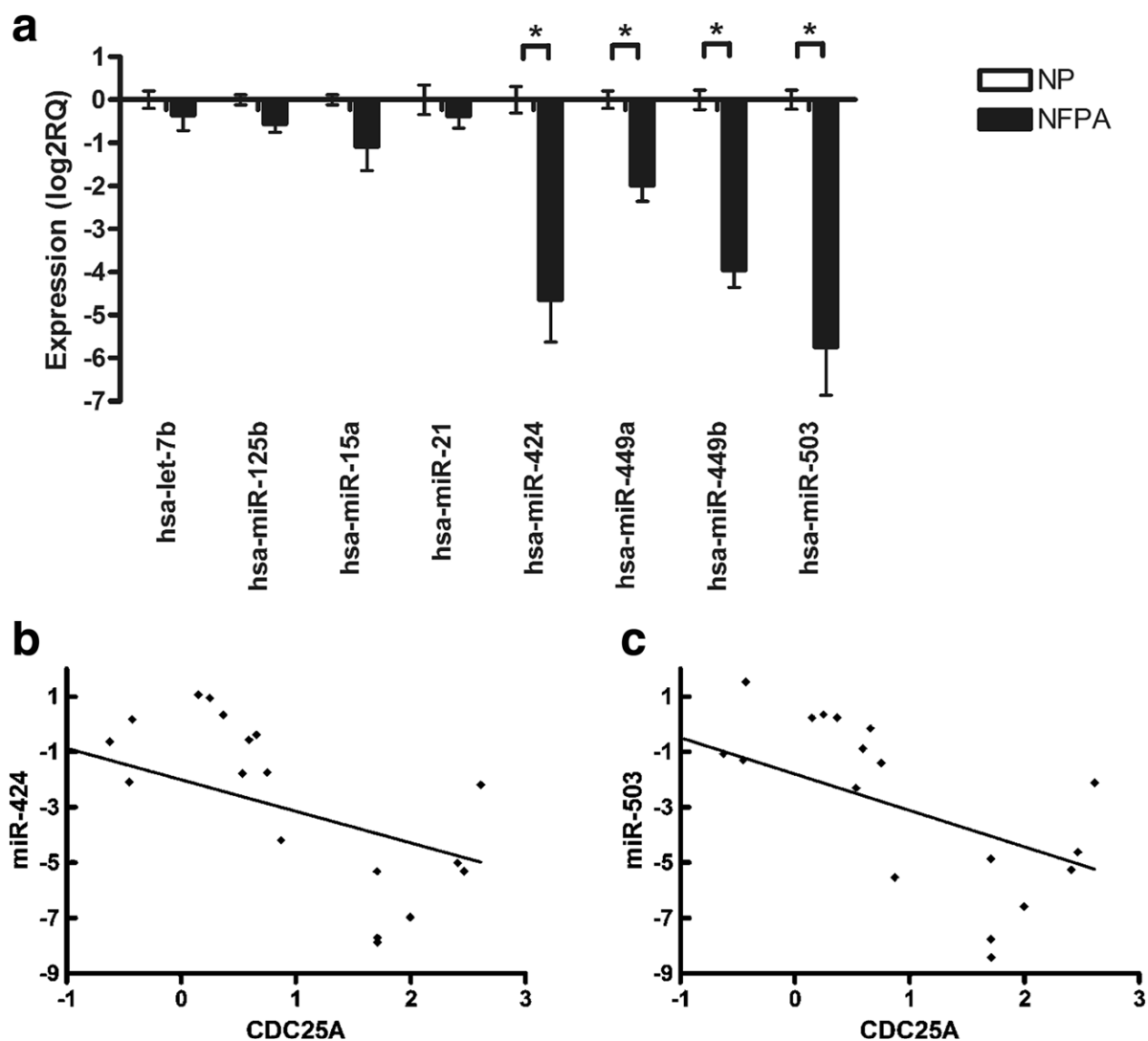
56. ábra: A CDC25A és CDC25C génexpressziója hormonálisan inaktív hipofízis daganatokban az ép szövethez képest (NP: ép hipofízis, NFPA: nem funkcionáló hipofízis adenoma, *: $p < 0.05$), [560].

A génexpressziót követően elemeztük a CDC25A, CDC25C, CDK1 és a P-CDK1 expressziót fehérje szinten is hipofízis szövetekben. Hasonlóan a génexpresszióhoz a CDC25A fehérje szinten is emelkedett expressziót mutatott a daganatokban az ép szövetekhez viszonyítva. A CDC25C fehérje szinten ezzel ellentétben nem különbözött az NFPA és ép szövetek között. A CDC25 család a sejtciklusban a CDK defoszforilálásával, aktiválásával a sejtciklus progresszióját okozza. A hipofízis daganatokban mind a pCDK1 mind pedig a CDK1 mennyisége meghaladta az ép szövetekben talált mennyiséget is.



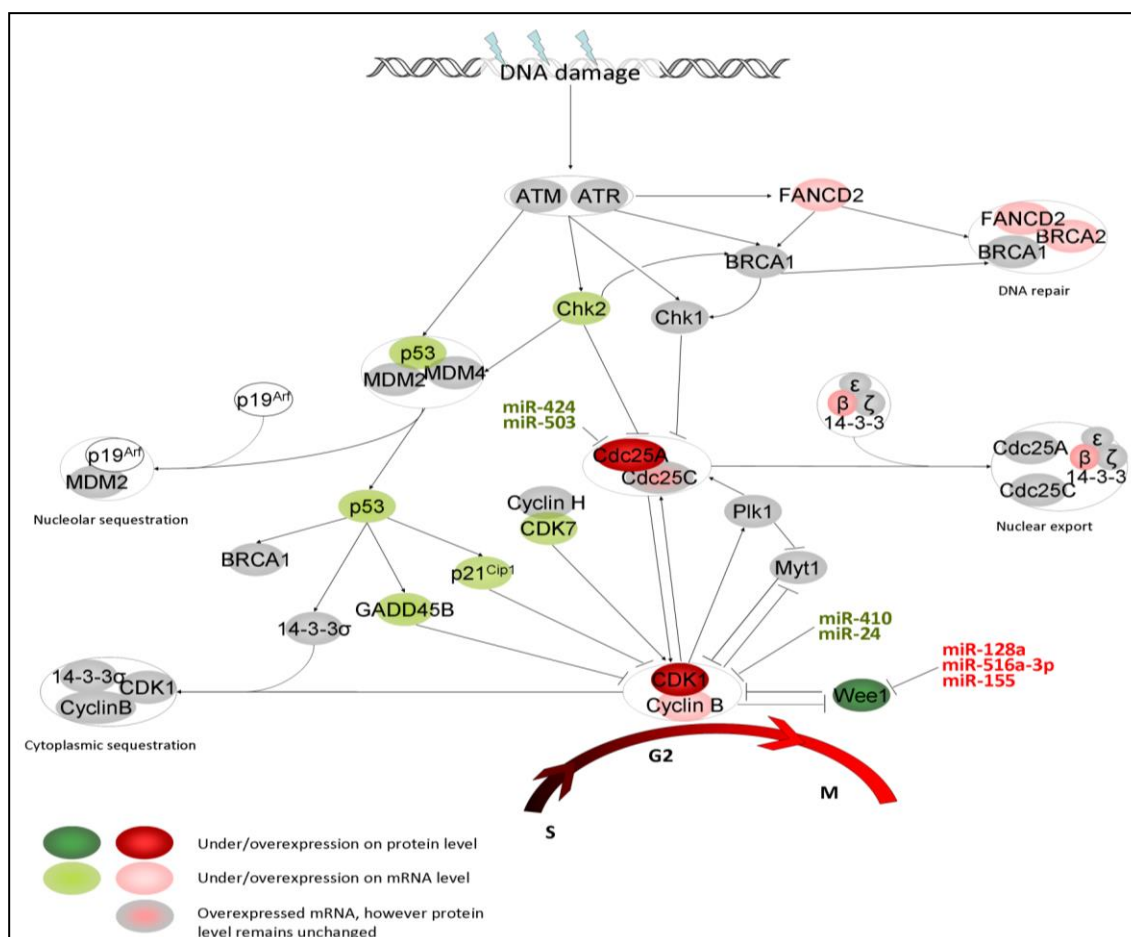
57. Ábra: A CDC25A, CDC25C, CDK1, pCDK1, CDK1/pCDK1 és a sejtmagi lokalizációjú (nCDK1) expressziója hipofízis daganatokban az ép szövethez viszonyítva [560].

A CDC25A-t potenciálisan célzó mikro-RNS-ek közül a hsa-miR-424 és hsa-miR-503 csökkent expressziót mutatott az NFPA szövetekben az ép hipofízisekhez képest és expressziójuk negatív korrelációt mutatott a daganatok méretével. Ezekben a szövetekben ez a két mikro-RNS tumorszuppresszorként funkcionál. Kísérletes eredmények már korábban igazolták a hsa-miR-503 és a hsa-miR-424 direkt interakcióját a CDC25A-val, ami megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a CDC25A fokozott expressziójához a hsa-miR-424 és hsa-miR-503 szintjének csökkenése hozzájárul. A két mikro-RNS expressziójának szintje negatív korrelációt mutatott a CDC25A expresszióval.



58. Ábra: a CDC25A és CDC25C-t célzó mikro-RNS-ek expressziója hipofízis szövetekben. Szignifikáns alulexpresszió volt igazolható a hsa-miR-424, hsa-miR449a, hsa-miR-449b és a hsa-miR-503 a daganatokban az ép szövethez képest (A panel) és a miR-424 és miR-503 expressziójának összefüggése a CDC25A expresszióval (B panel), [560].

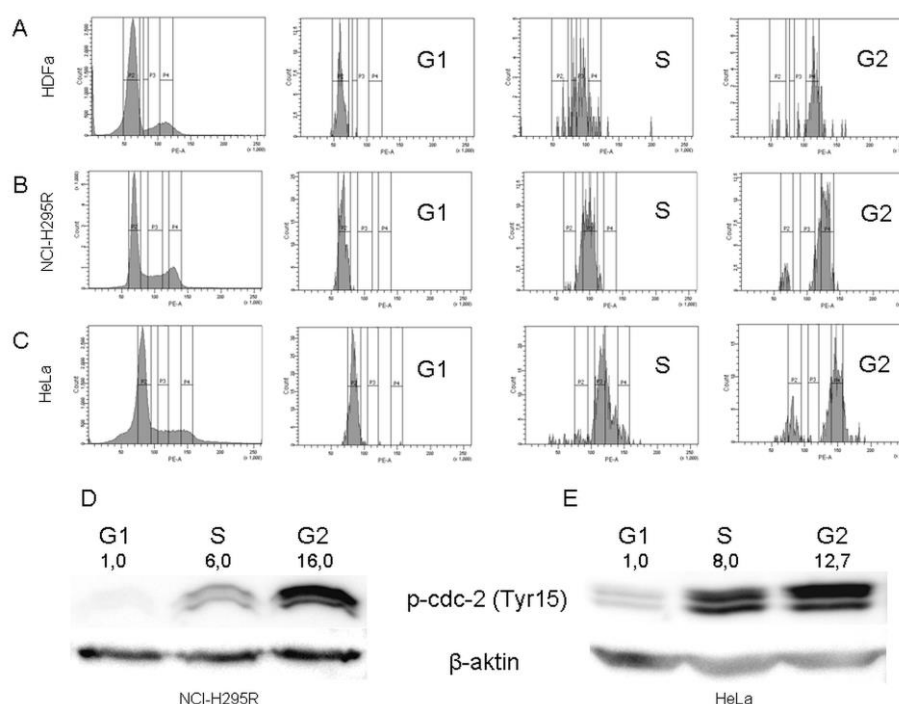
Eredményeink alapján a sejtciklus G2/M átmenetében kulcsfontosságú két molekulacsoport (WEE1 és CDC25) komplex, mikro-RNS-ek általi szabályozás alatt is állnak, amelyek a hormonálisan inaktív hipofízis daganatok pathomechanizmusában lehet szerepe.



59. ábra: A sejtciklus G2/M átmenetének mikro-RNS általi szabályozása hormonálisan inaktív hipofízis daganatokban

VI.2.11. *A sejtciklus-dependens ingadozást mutató gén és mikro-RNS expresszió vizsgálata, új áramlási citometriás módszer kidolgozása a sejtek sejtciklus szerinti sejtválogatására*

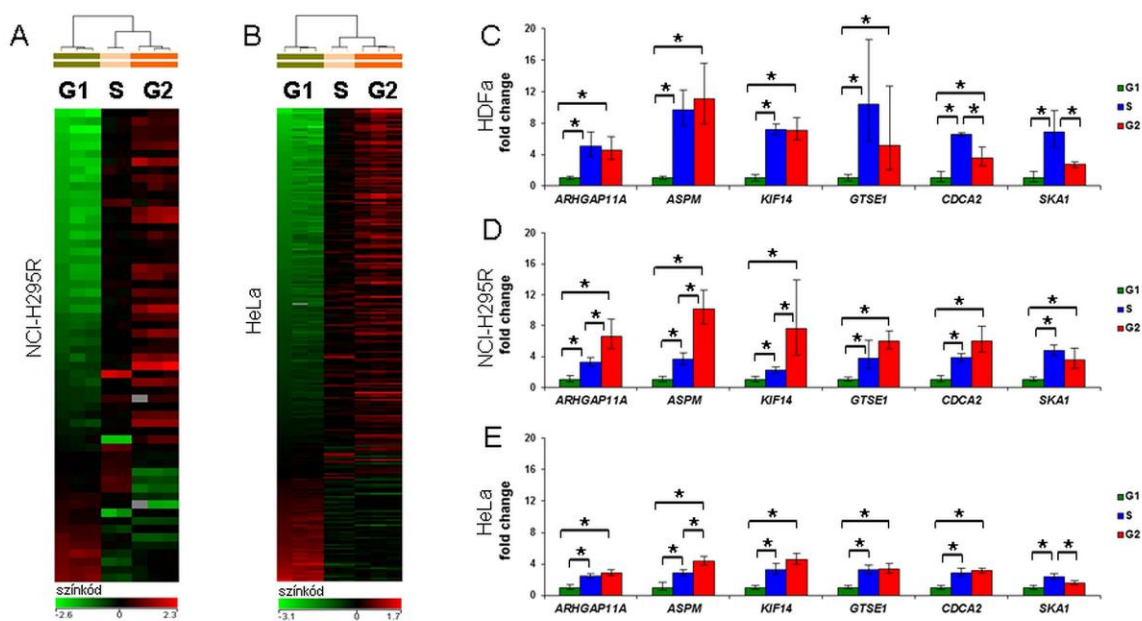
Munkánk során kidolgoztunk egy új, áramlási citomerián alapuló sejt szortolási módszert. Az optimalizált sejtciklus szortolás sikeresen és nagy tisztasággal izolálta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejteket HDFa, NCI-H295R és HeLa tenyészetekből. Az egyes sejtciklusfázisok specifikus kiválogatása a különböző sejtípusokban változó volt, de minden esetben meghaladta a korábbi, szinkronizálási módszerekkel nyert eredményeket. Minden sejtípusban a G1 fázis szortolása sikerült a legnagyobb tisztasággal, míg NCI-H295R és HeLa sejtekben az S fázisba szortolt sejtek tisztasága meghaladta a G2 fázis tisztaságát. Validálásként Western blot segítségével a CDC2 Tyr15-os foszforiláltságának változását ellenőriztük a szétválogatott sejteken, ami megerősítette az áramlási citométeres módszer hatékonyságát.



60. ábra - A sejtciklus szort és validálása - A-C: Reprezentatív pre- (első hisztogram) és poszt-szort (G1-fázis: második, S-fázis: harmadik, G2-fázis: negyedik hisztogrammok) FACS analízisek HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C) sejteken. D-E: A p-cdc-2 (Tyr15) Western blot analízise validálja a különböző fázisok sikeres szegregációját NCI-H295R (D) és HeLa (E) sejteken. A p-cdc-2 relatív denzitását először β-aktinra, majd G1 fázisra normalizáltuk és ábrázoltuk a D és E paneleken. Ábra forrása: [561]

A CDC-2 fehérje Tyr15 foszforiláltsága szigorúan szabályozott a sejtciklus folyamatában; a foszforiláltság folyamatosan fokozódik a sejtciklus előrehaladtával a G2-fázisig, a mitózisba lépéshez ugyanakkor defoszforilált állapot szükséges [342]. Ez alapján a foszforiláltság szintje a sejtciklus aktuális állapotának indikátora. A szortolt populációkon végzett Western blot vizsgálatok sikeresen validálták a sejtciklus szort módszert fehérje szinten is (**60. ábra**).

Az elvégzett génexpressziós microarray vizsgálatok NCI-H295R sejtben 55, míg HeLa sejtben 252 szignifikánsan sejtciklusdependens expressziót mutató transzkriptumot igazoltak (**61. ábra**). A sejtciklusdependens expressziót mutató gének többsége a sejtciklus előrehaladtával egyre fokozottabb expressziót mutat.



61. ábra - A sejtciklusdependens transzkriptok azonosítása microarray módszerrel és annak validálása qRT-PCR módszerrel – A és B: a szignifikánsan sejtciklusdependens expressziót mutató mRNS transzkriptumok hőterképei NCI-H295R (A) és HeLa (B) sejtekben. A hőterképen szereplő gének megnevezése az 1. és 2. kiegészítő táblázatban található. A hőterképek felett feltüntetjük a fázisok hierarchikus csoportosítását is. Panel C-E: A microarray analízis alapján kiválasztott 6 gén sejtciklusdependens expressziójának validálása HDFa (C), NCI-H295R (D) és HeLa (E) sejteken. * $p < 0,05$. Ábra forrása: [561]

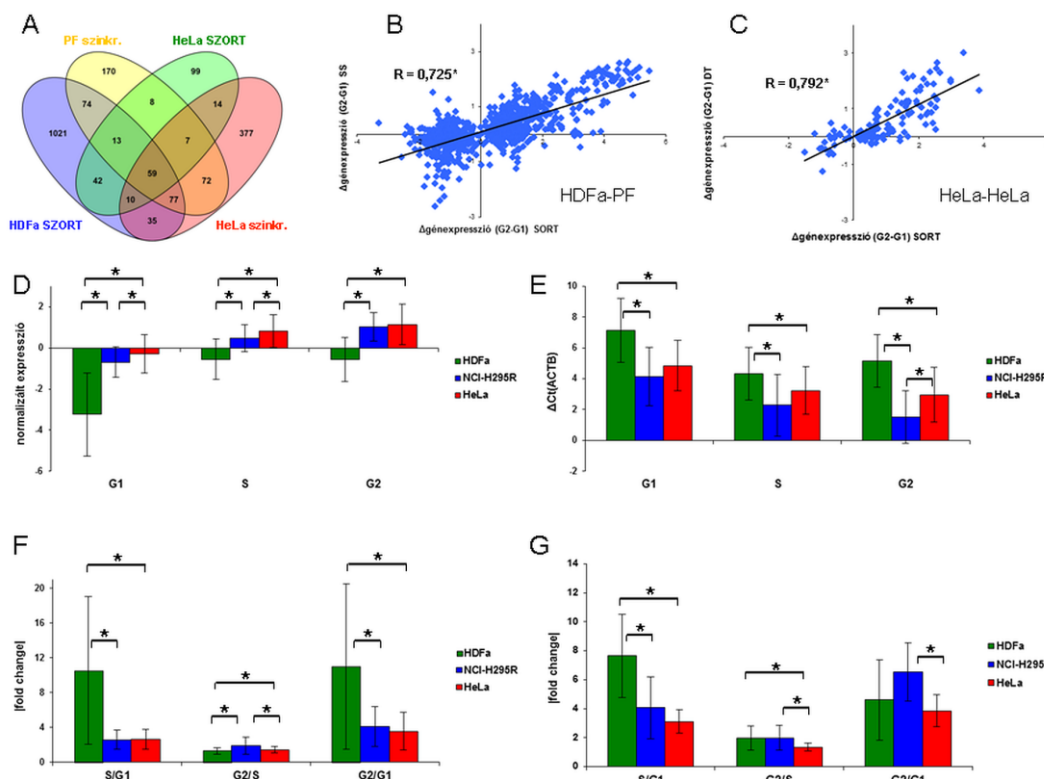
A hierarchikus csoportosítás kimutatta, hogy ezen gének S és G2 fázisokban észlelt expressziós szintjei közelebb állnak egyáshoz, mint a G1 fázishoz. HDFa sejtben a rigorózus statisztikai analízis nem detektált szignifikánsan eltérő gént. Ugyanakkor, a HDFa sejtben a különböző fázisok közötti összehasonlítások legalább egyikében legalább kétszeres expresszió-változást mutató (FC2 génlista) gének útvonal-analízise a sejtciklussal szorosan összefüggő folyamatok detektálásával igazolja, hogy ezen expresszió-változásoknak szerepük van a sejtciklus szabályozásában. Emellett ezen FC2 génlistába tartozó gének a sejtciklus során észlelt expresszióváltozásai szignifikánsan korrelálnak a korábbi, szinkronizáláson alapuló módszerekkel detektált sejtciklusdependens transzkripciós programmal.

A microarray vizsgálatok alapján kiválasztott hat gén sejtciklusdependens expresszióját sikeresen validáltuk qRT-PCR vizsgálattal mindhárom vizsgált sejtípusban (62. ábra).

A három vizsgált sejtípus sejtciklusdependens transzkripciós programján elvégzett bioinformatikai útvonal-analízis mindhárom esetben a sejtciklussal szorosan összefüggő biológiai útvonalakat mutatott. Mindhárom esetben a “sejtciklus”, a “sejtszintű összeszerelés és elrendezés” valamint a “DNS replikáció, rekombináció és javítás” voltak a legérintettebb útvonalak.

Mivel a szinkronizálási módszerekkel a sejtciklusdependens transzkripciós program vizsgálatában való alkalmazásával kapcsolatban számos aggály merült fel, összehasonlítottuk a sejtípusonként a sejtciklus szort módszerrel nyert eredményeket a korábbi, szinkronizálási

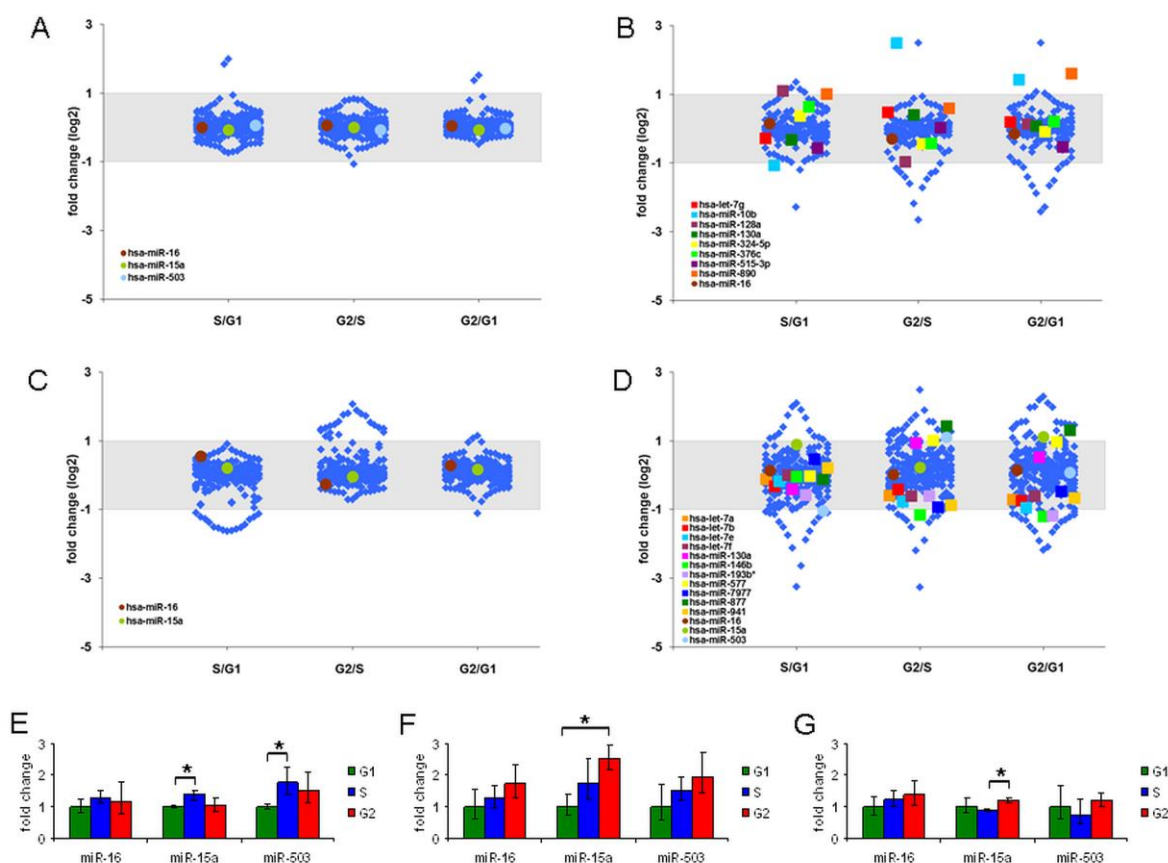
módszerekkel nyert eredményekkel. Az összehasonlítás során jelentős átfedést találtunk a sejtciklus szort és a szinkronizálási módszereken alapuló eredmények között, valamint – mind primer fibroblaszt, mind HeLa sejtek esetében – szignifikáns korrelációt találtunk a két módszer eredményei között [373,376,401] (62. ábra).



62. ábra – A szinkronizálás és a sejtciklus szort eredményeinek összehasonlítása a sejtciklusdependens transzkripció program tekintetében és a sejtciklusdependens transzkripció program dinamikájának összehasonlítása primer, nemtranszformált és tumort sejtekben – Sejtciklusdependens expressziót mutató gének Venn diagramja primer fibroblaszt (sejtciklus szort – HDFa SZORT és szinkronizáláson alapuló korábbi eredmények – PF szinkr. [368]) és HeLa (sejtciklus szort – HeLa SZORT és szinkronizáláson alapuló korábbi eredmények – HeLa szinkr. [367]) sejteken (A). Pearson-féle korrelációs analízis a szinkronizálással és a sejtciklus szorttal detektált génexpressziós különbségek összehasonlítására primer humán fibroblaszt (B; szinkronizálási módszer: szérum éheztesítés) és HeLa (C, szinkronizálási módszer: dupla timidin blokk) sejteken. D-E: A sejtciklusdependens gének normalizált expressziós szintjei az egyes fázisokban és sejtípusokban microarray (D) és qRT-PCR (E) eredmények alapján. F-G: A sejtciklusdependens gének expressziós szintjei változásainak nagysága S/G1, G2/S és G2/G1 fázisok között a különböző sejtípusokban microarray (F) és qRT-PCR (G) eredmények alapján. Az adatok átlag $\pm$ standard deviáció formában vannak ábrázolva. Rövidítések: DT – dupla timidin blokk, SS – szérum éheztesítés, PF – primer fibroblaszt. * $p < 0,05$. Ábra forrása: [561]

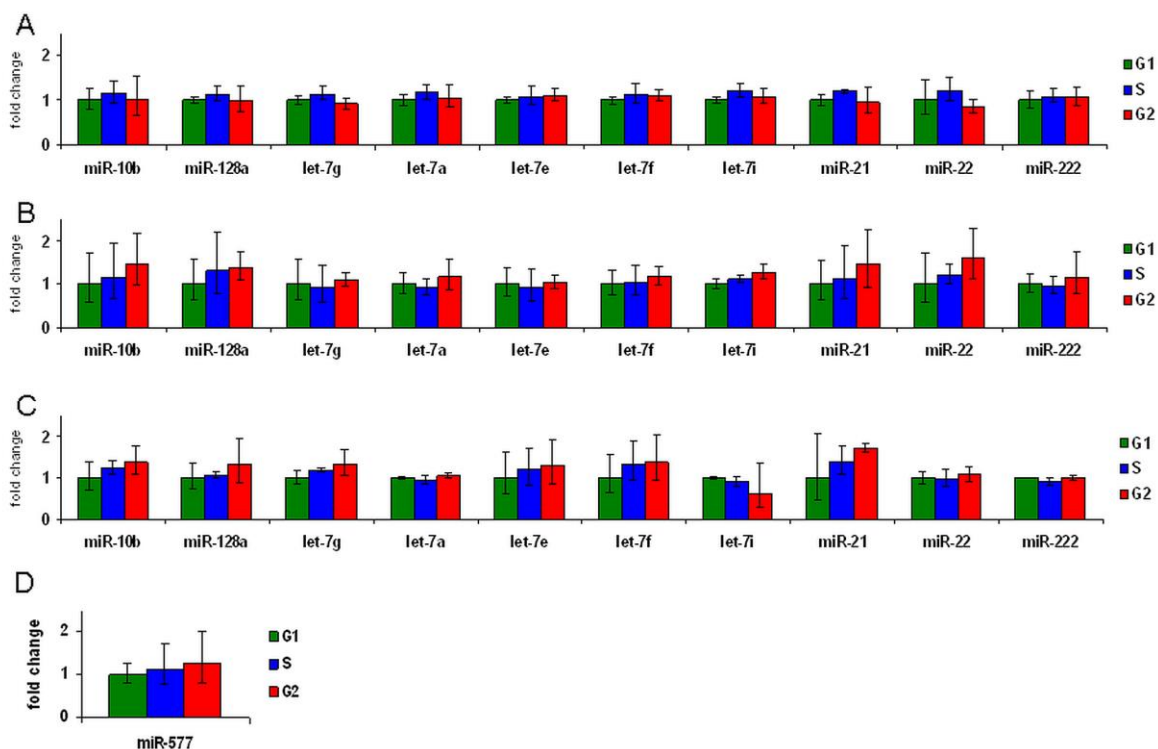
Három nagyátíróképeségű technikát (microarray, qRT-PCR alapú TLDA, Illumina kis RNS szekvenálás) alkalmaztunk a sejtciklusdependens mikro-RNS expresszió vizsgálatára (63. ábra). Ezek közül a microarray eredmények mutatták a legkisebb változásokat, melyek közül egy sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A qRT-PCR alapú TLDA módszerrel 8 miRNS mutatott szignifikáns expressziós különbségeket a sejtciklus fázisai között, melyek közül a hsa-

miR-10b, hsa-miR-128a és a hsa-miR-890 mutatott nagyobb, mint kétszeres expressziós változásokat a fázisok között. Ezen változásokat ugyanakkor nem sikerült qRT-PCR módszerrel validálni (64. ábra). A kis-RNS szekvenálás bizonyult a legszélesebb dinamikus mérési tartománnyal rendelkező módszernek. Ezzel a módszerrel HeLa sejtekben 11 szignifikáns mikro-RNS-expressziós különbséget találtunk, melyek közül a hsa-miR-146b, a hsa-miR-577, a hsa-miR-877 és a hsa-miR-193b* esetében nagyobb, mint kétszeres expressziós változások is ábrázolódtak



63. ábra – Sejtciklusdependens mikro-RNS expresszió vizsgálata nagyáteresztőképességű technikákkal és a hsa-miR-16 család néhány tagja expressziójának vizsgálata qRT-PCR módszerrel – MiRNS expressziók log2-transzformált fold change értékei S/G1 G2/S és G2/G1 összehasonlításokban különböző nagyáteresztőképességű mérések alapján NCI-H295R sejtben microarray (A) és TLDA (B) módszerrel, HDFa sejtben microarray módszerrel (C) és HeLa sejtben kis RNS szekvenálással (D). Szürke háttér jelöli a fold change < 2 eltérések területét. Színezett négyzetek jelölik a szignifikánsan ($p < 0,05$) változó expressziót mutató miRNS-ek változását, míg színezett körök jelölik a hsa-miR-16 család néhány tagjának változását, amennyiben volt rájuk adat (az NCI-H295R sejt kis RNS szekvenálási eredményeit és a validációs próbálkozásokat -, mivel csoportonként csupán egy minta volt kis RNS szekvenálással vizsgálva és így statisztika ebből a mérésekből nem volt elérhető – az 1. kiegészítő ábrán mutatjuk be). A miR-16 család néhány tagjának expressziója a sejtciklus különböző fázisaiban qRT-PCR mérések alapján HDFa (E), NCI-H295R (F) és HeLa (G) sejtben. Az adatok átlag $\pm$ standard deviáció formában vannak ábrázolva.* $p < 0,05$. Ábra forrása: [561]

Ezen változások ugyanakkor szintén nem voltak validálhatóak qRT-PCR módszerrel sem HeLa, sem NCI-H295R sejtekben, de a négy nagyátersztőkéességű méréseken stabil expressziót mutató mikro-RNS-t mérése megerősített ezen mikro-RNS-k sejtciklustól független kifejeződését (64. ábra).



64. ábra – A nagyátersztőkéességű mikro-RNS vizsgálatok validálási kísérletei qRT-PCR módszerrel HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C, D) sejteken – A hsa-miR-10b, hsa-miR-128a és a hsa-let-7g a TLDA mérések alapján, a hsa-let-7a, hsa-let-7e, hsa-let-7f a kis RNS szekvenálási eredményei alapján lettek kiválasztva. A hsa-let-7i, hsa-miR-21, hsa-miR-22 és hsa-miR-222 miRNS-k stabil, sejtciklustól független expressziót mutattak a nagyátersztőkéességű eredményeken és a stabil mikro-RNS expresszió validálása céljából lettek vizsgálva. Emellett – a kis RNS szekvenálás eredményeiből kiindulva –, vizsgáltuk a hsa-miR-577 mikro-RNS expresszióját HeLa sejtben is, mely nem validálta ennek sejtciklusdependens expresszióját (D). Az adatok átlag $\pm$ standard deviáció formában vannak ábrázolva. Az elvégzett statisztikai analízisek egyetlen esetben igazoltak szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést. Ábra forrása: [561]

Mivel a hsa-miR-16 család számos tagja igazolt sejtciklust befolyásoló hatással bír és kifejezett expresszió-változásukat igazolták nyugalmi G0 és aktívan proliferáló sejttenyészetek között [431], qRT-PCR vizsgálatokat végeztünk a hsa-miR-16, a hsa-miR-15a és a hsa-miR-503 sejtciklusdependens expressziójának irányába mindhárom vizsgált sejt típuson, ami kis (statisztikailag nem szignifikáns) amplitúdójú változást igazoltak.

Kutatómunkánk ezen részének legfontosabb eredménye egy olyan új módszer kidolgozása volt, amivel elérhetővé vált a sejtciklusfüggő gén, mikro-RNS és akár fehérjék gyógyszermentesen

történő vizsgálata A korábbi szinkronizálási módszerek növekedési imbalance (growth imbalance) és a ciklinek expressziójának időelőtti fokozódást okozzák [373,374], valamint – bizonyos gátlószerek (pl. timidin) esetén – a DNS szintézis gátlásának eredményeképpen aktiválódik a G2/M ellenőrzőpont és az ATM/ATR jelátvitel [375]. Mindezen hatások együttes eredője megmászhatja a valódi folyamatokat. Munkánk során a Shedden és Cooper által leírt szigorú kritériumrendszert tartottuk szem előtt [401], amelyben foglaltak teljesítése szerintünk is előfeltétele a natív sejtciklus sejtciklusfüggő transzkripció programja leírásának.

Vizsgálatunkhoz felhasználtuk a szabadon elérhető, korábbi szinkronizálással elért sejtciklusfüggő génexpressziós adatsorokat primer fibroblaszt és HeLa sejtekből [367,368], és a G2 és G1 fázisok közötti génexpressziós eltéréseket hasonlítottuk össze. A két módszer között igazolt szoros korreláció megerősítette módszerünk sikerességét.

Miután sikeresen igazoltuk a sejtciklus szort kitűnő alkalmazhatóságát a sejtciklusdependens folyamatok vizsgálatában, további analíziseket végeztünk a sejtciklusdependens transzkripció program dinamikájának megismerése érdekében. Feltételeztük, hogy sejtípustól független, univerzális humán sejtciklusfüggő transzkripció program dinamikája megváltozik a malignus transzformáció hatására. Malignus transzformáció során a sejtciklus különböző fázisainak hossza egyenlőtlenül rövidül [562]. A *HRAS*, *SRC*, *MYC*, *CCND1* protoonkogének aktivációja [563–565] valamint a *PTEN* tumor szuppresszor kiesése [566] a G1 fázis rövidülését eredményezi [562]. Emellett a kulcsfontosságú M fázis regulátor *LZTS1* és *LATS2* gének hiánya az M fázis rövidüléséhez vezet [562,567,568]. Mivel az S és G2 fázisok hossza lényegesen nem változik, így – a malignus transzformáció során megváltozott sejtciklus-dinamika következtében – az S és G2 fázisú sejtek aránya relatíve megnő. Bar-Joseph és munkatársai tanulmánya kimutatta, hogy bizonyos géncsoportok specifikusan a primer, nemtranszformált, más géncsoportok pedig specifikusan a malignus transzformáción átesett sejtekben mutatnak sejtciklusdependens kifejeződést [368].

Eredményeink szerint a sejtciklusfüggő transzkripció program génjei minden fázisban magasabb expressziót mutattak a transzformált sejtekben a primer, nemtranszformált sejtek megfelelő fázisaiban észlelt expresszióhoz képest. Így a fentebb leírt – a sejtciklus egyes fázisai időtartamának változásaiból adódó – fázisfüggő mód mellett - egy fázisfüggetlen expresszió-növekedés is jellemzi a malignusan transzformált sejteket. Emellett a G1/S és az S/G2 fázisok között ezen sejtciklus-gének expresszió-változásai jóval alacsonyabbak tumorosan transzformált sejtekben a primer, nemtranszformált sejtekben észleltekhöz képest. Ez utóbbi különbségért felelős lehet a nemtranszformált, primer sejtekben leírt hosszabb és jobban szabályozott G1 fázis és különösen a szigorúbban szabályozott G1/S átmenet [562]. Emellett a tumoros átalakulásban szerepet játszó Myc-amplifikáció következtében stimulálódó E2F expresszió-fokozódás is szerepet

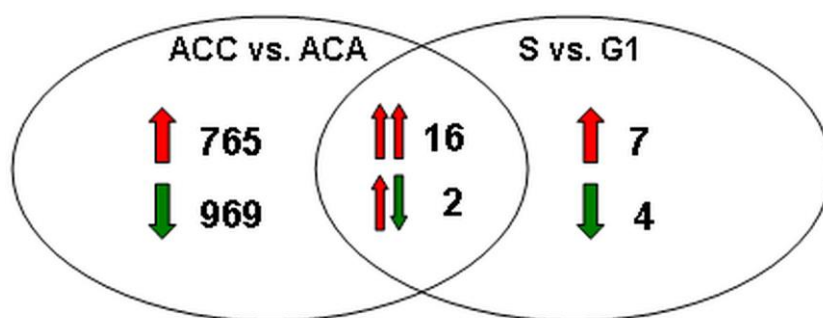
játszhat a G1 és S fázisok között észlelt alacsonyabb génexpressziós változásokban, mivel a Myc-amplifikáció következtében fokozódó E2F expresszió facilitálja a G1/S átmenet transzkripció programját [569,570].

Eredményeink másik része igazolta a mikro-RNS expresszió stabil, sejtciklusfüggetlen voltát. Ez némileg váratlan volt a korábbi adatok ismertetében, amelyek azt mutatták, hogy a mikro-RNS-ek számos ponton befolyásolják a sejtciklus működését [428]. A szövetspecifikusan onkogén (onko-miR) és tumorsuppresszor (TS-miR) mikro-RNS-ek expresszióinak megváltozása – a sejtciklus folyamatainak gyorsításán keresztül [426,427] – hosszú távon számos daganat kialakulásában játszik szerepet [571–573]. Három nagyáteresztőképességű módszerrel (microarray qRT-PCR alapú TLDA és kis RNS szekvenálás) megmérve a mikro-RNS expressziót három különböző sejttypusban megerősíti azt, hogy ez a jelenség egy univerzális mechanizmus. Ugyan a mikro-RNS-ek sejtciklust befolyásoló hatásai sokrétűek és számos mikro-RNS vesz részt szövetspecifikusan a malignitás mintázat kialakításában, eredményeink alapján azt valószínűsítjük, hogy ezen expressziós változások a daganatképződés során, hosszabb idő alatt alakulnak ki. Ezt támasztja alá az a megfigyelések is, melyek számos mikro-RNS gén delécióját vagy folyamatos transzkripció csendesítését igazolták krónikus limfoid leukémia kialakulása során [416,417]. A tartós transzkripció csendesítés vagy a mikro-RNS gének deléciója is valószínűtlenné teszi ezen mikro-RNS-ek expressziójának dinamikus változásait a sejtciklus folyamataiban. Hausser és munkatársainak matematikai és experimentális eredményei a mikro-RNS expressziós változások translációra gyakorolt hatásaival kapcsolatban arra a következtetésre jutott, hogy ezen folyamatok lassabbak a korábban feltételezetténél [574], amelynek hátterében a mikro-RNS-ek összetett biogenezisét és érését, valamint az Argonaute proteinnel kialakítandó komplex kialakulásának összetettségét írták le [574].

VI.2.12. *Sejtciklus-dependens módon expresszáldó, új biomarker a mellékvesekéreg-rák prognózisában*

A mellékvesekéreg-karcinóma malignitás mintázatát összehasonlítottuk az NCI-H295R sejtciklusdependens transzkripció programjával. Összesen 1752 gén mutatott szignifikáns, legalább kétszeres expressziós különbséget ACA és ACC között, míg az S/G1 összehasonlításban 29 gén expressziója változott dinamikus.

A három reanalizált microarray tanulmány [115–118] átlagában 1752 gén mutatott szignifikáns, legalább kétszeres expressziós különbséget ACA és ACC között. Az S/G1 összehasonlításban 29 gén mutatott szignifikáns, legalább kétszeres expressziós különbséget NCI-H295R humán ACC sejtvonalon. A két lista metszetét a **11. ábra** és az **5. táblázat** részletezi.



65. ábra – Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R sejtciklusdependens transzkripció programjának Venn diagramja – Piros nyilak a szignifikáns felülexpressziót, zöld nyilak a szignifikáns alulexpressziót, a mellettük lévő számok a változó gének számát jelölik. A metszetben a dupla nyilak a ACC vs. ACA változást (bal nyíl) és a S vs. G1 változást (jobb nyíl) jelölik. A metszethez tartozó gének az 5. táblázatban vannak részletezve. Ábra forrása: [518]

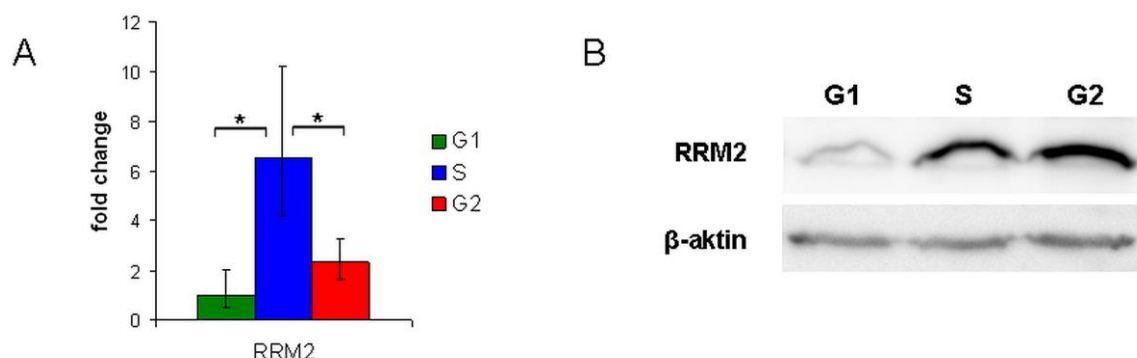
Az S vs. G1 összehasonlításban változó gének többsége része a malignitás mintázatnak is. A két halmaz metszetének tagjai közül az RRM2 (ribonukleotid reduktáz M2 alegység) és az ASPM (abnormális orsó-homológ, microcephalia-asszociált) gének voltak felülexpresszálva mindhárom ACC vs. ACA microarray tanulmányban, emellett az RRM2 mutatta a legmagasabb génexpressziós különbséget S vs. G1 összehasonlításban (**37. táblázat**). A továbbiakban kutatásainkat az RRM2 irányában folytattuk tovább.

37. táblázat – Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R sejtciklusdependens transzkripció programjának metszetéhez tartozó gének – A 11. ábrán bemutatott Venn diagram metszetéhez tartozó gének és azok expresszióváltozásai bemutatása. A hiányzó adatok nem szignifikáns vagy FC < 2 szignifikáns eltérések. A malignitás mintázathoz tartozó gének Szabó Péter és munkatársai közlése [118] alapján. Táblázat forrása: [518]

gének	fold change (ACC vs. ACA)				fold change S- vs. G1-fázis
	de Reynies és mtsai. [115]	Giordano és mtsai. [116]	Tömböl és mtsai. [117]	átlag	
<i>RRM2</i>	5,245	12,662	9,586	9,164	5,365
<i>HJURP</i>		2,709	7,373	5,041	5,120
<i>SPC24</i>			8,543	8,543	5,022
<i>WDR62</i>			2,597	2,597	4,414
<i>RTKN2</i>			7,382	7,382	4,410
<i>CDCA2</i>		3,084	13,485	8,285	4,068
<i>SKA1</i>			7,462	7,462	3,638
<i>GTSE1</i>		3,949	6,678	5,314	3,614
<i>STIL</i>		2,671	3,114	2,893	3,415
<i>ASPM</i>	3,466	11,213	28,779	14,486	3,307
<i>IQGAP3</i>		2,169		2,169	3,296
<i>ARHGAP11A</i>			8,580	8,580	3,283
<i>PLK4</i>		2,201	2,279	2,240	3,086
<i>CDKN2D</i>			4,593	4,593	2,733
<i>SMC2</i>		2,571		2,571	2,676
<i>KIF14</i>		4,031	9,100	6,566	2,472

<i>COL1A1</i>		2,680		2,680	-3,805
<i>HOXB13</i>			10,458	10,458	-3,615

A kiválasztott RRM2 sejtciklusdependens expresszióját sikeresen validáltuk sejtciklus szortolt NCI-H295R mintákból mRNS és fehérje szinten is (**66. ábra**). A korábban leírt észrevételeknek megfelelően, a G1-fázisban alacsony expressziós szint S-fázisban nő meg, ahol a ribonukleotid reduktáz enzimkomplex részeként kulcsfontosságú a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulásban [575].



66. ábra – Az RRM2 sejtciklusdependens expressziójának igazolása sejtciklus szortolt NCI-H295R sejteken – Igazolás mRNS szinten qRT-PCR módszerrel (A) és fehérje szinten Western blot módszerrel (B). Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva.* $p < 0,05$. Ábra forrása: [518]

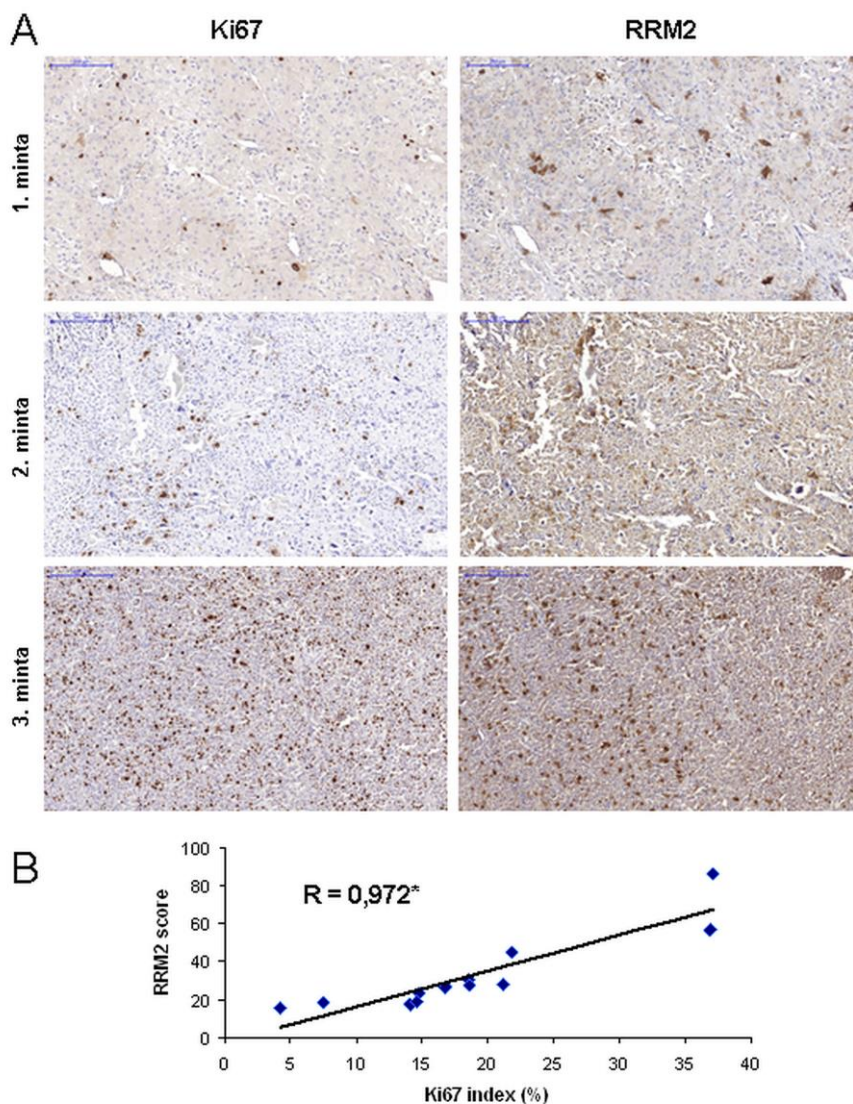
Az RRM2 a ribonukleotid reduktáz (RR) enzimkomplex alkotója, mely a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulás katalizálásán keresztül [576] a DNS szintézis sebességének egyik meghatározója [577]. Génje evolúciósan egy transzlációsan szigorúan szabályozott szakaszon van kódolva [578], melynek komoly szerepe van az RRM2 S-fázis dependens aktivitásának kialakításában [575,579]. A transzláció szabályozása mellett az RRM2 relatív rövid félféltideje is hozzájárul a fehérje sejtciklusfüggő aktivitáshoz.

Ezt követően, az in vitro eredmények birtokában után kíváncsiak voltunk, hogy mellékveserákban hogyan expresszálódik az RRM2. Tizenkét, szövettanilag igazolt humán ACC-n végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat az RRM2 és Ki67 fehérjék meghatározásának irányában. A daganatok jellemzőit a 37. táblázat, az immunhisztokémiai reakciók eredményeit a 67. ábra szemlélteti (67. ábra).

38. táblázat – A vizsgálatokba bevont ACC minták jellemzése - N: nő, F: férfi.

sorszám	nem	életkor (év)	legnagyobb átmérő (mm)	módosított Weiss score	Ki67 index (%)	RRM2 score
1	N	62	85	5	14,8	23,3
2	F	79	120	5	7,5	18,2

3	N	46	200	6	36,9	56,7
4	F	25	100	6	14,1	17,5
5	N	50	120	5	14,6	18,6
6	N	55	90	6	21,2	28,0
7	N	69	110	6	21,8	44,8
8	N	61	80	5	16,8	26,8
9	N	54	80	5	18,5	30,2
10	N	62	130	6	4,2	15,7
11	N	61	120	5	18,6	27,6
12	N	47	140	5	37,1	86,2

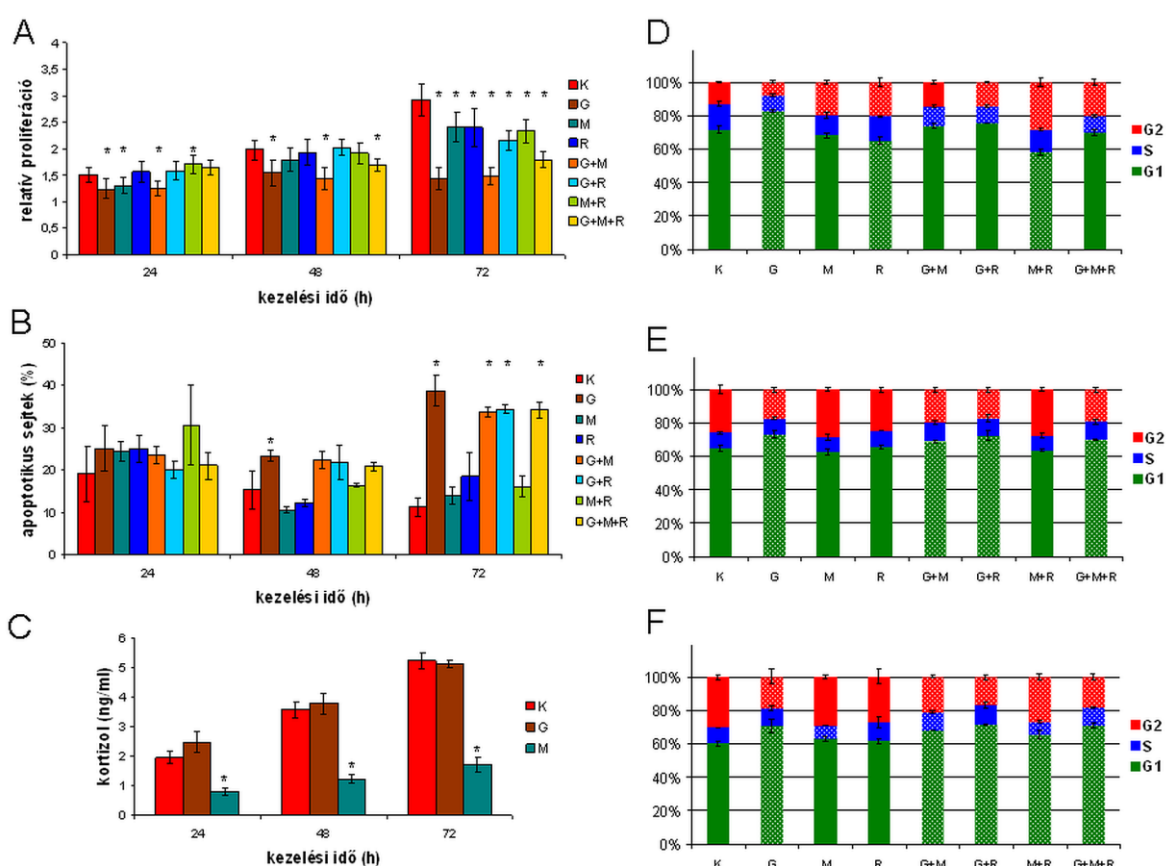


67. ábra – A Ki67 és RRM2 expresszió vizsgálata humán ACC mintákon – 3 reprezentatív minta ugyanazon területének Ki67 (bal oszlop) és RRM2 (jobb oszlop) festődése (A). A kék skála 200 μ m-nek felel meg, nagyítás: $\times 100$. A Ki67 index és az RRM2 score korrelációjának vizsgálata (B).* $p < 0,005$. Ábra forrása: [518]

A korlátozott esetszámon végzett vizsgálatunk kitűnő korrelációt mutatott az egyes ACC-k Ki67 és RRM2 expressziója között. Ez alapján – nagyobb esetszámon végzett hasonló megerősítő eredmények esetén – felmerül az RRM2 expresszió vizsgálatának jelentősége az ACC hisztopatológiai diagnózisában. Korábbi vizsgálatok már igazolták az RRM2, mint proliferációs

marker jelentőségét vastagbélrákban [580,581], emlőrákban [582,583], nem-kissejtes tüdőrákban [584] és hepatocelluláris karcinómában [585] is. A vizsgálatok megerősítették a magas RRM2 expresszió összefüggését a rosszabb prognózissal is [581,583,584].

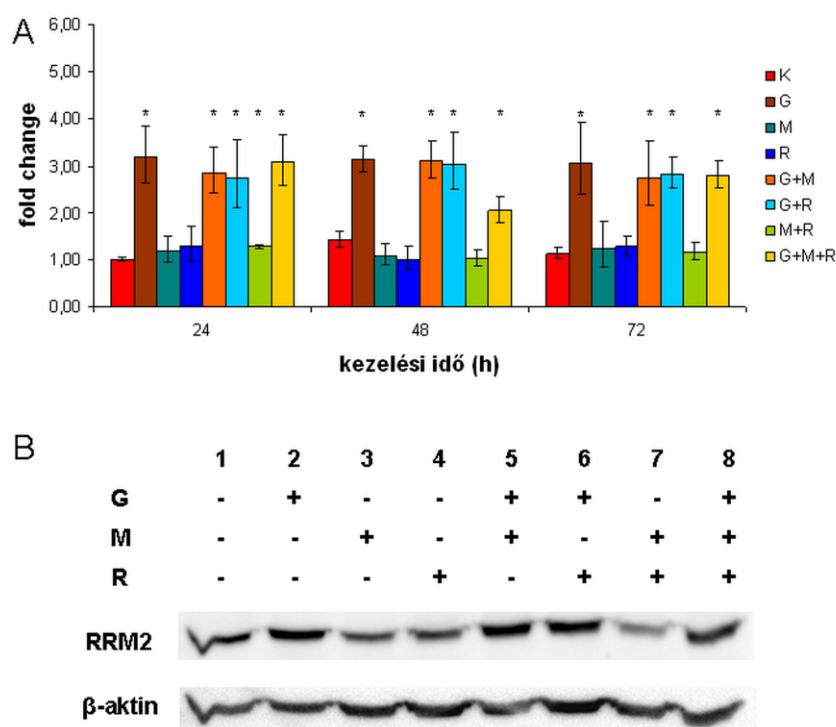
Az ACC gyógyszeres terápiájában az egyetlen mellékvesekéreg-specifikus szer a mitotán (M) [93], míg a betegség előrehaladott állapotában számos citosztatikus szer alkalmazásával próbálkoznak, korlátozott eredménnyel [586–589]. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai felvetették a 9-cis-retinsav (R) potenciális terápiás hatékonyságát ACC-ben, míg a jelen munkánk beazonosította az RRM2-t, ami egyrészt jó diagnosztikai marker lehet ACC-ben, de esetleg a hasnyálmirigyrákhoz hasonlóan terápiás célpontként is vizsgálható. A gemcitabin (G) specifikus RRM2 gátlószer. Ezen előzetes eredmények alapján a következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk az RRM2 expressziót az ACC-ben alkalmazott kemoterápiás kezelések után.



68. ábra – A különböző kezelések hatása az NCI-H295R sejtek proliferációjára, apoptózisára, kortizoltermelésére és sejtciklusára – Az ábra a proliferációra (A), az apoptózisra (B), a kortizoltermelésre (C) valamint a sejtciklus fázisainak megoszlására 24 (D), 48 (E) és 72 (F) órás kezeléseket követően mért értékeket mutatja be. K – kontroll, G – gemcitabin, M – mitotán, R – 9-cis-retinsav. Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. A csillagok (A-C) és a fehérén pontozott oszlopok (D-F) a kontrolltól való szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést jelölik. Ábra forrása: [518]

Ahogy az a 68. ábrán látható mindegyik kezelés csökkentette a sejtek proliferációját, a G kezelés már korábbi időpontokban és nagyobb mértékben csökkentette a proliferációt. Ennek hátterében a G apoptózist serkentő szerepe állhat [586]. Mivel egy korábbi, a G hatásait az NCI-H295R sejtvonalon vizsgáló közlemény nem vizsgálta a G hatását a sejtvonal szteroidtermelésére, megvizsgáltuk a kortizoltermelésre gyakorolt hatását. Amíg a M esetében sikerült kimutatnunk a korábbiakban már igazolt adrenolitikus hatását [590], a G nem befolyásolta az NCI-H295R sejtvonal kortizoltermelését. A sejtciklus fázisainak eloszlását célzó vizsgálataink a G1 fázisú sejtek arányának megnövekedésével igazolták a G korai S-fázist gátló hatását [586]. A M és a R emelte a G2 fázisú sejtek arányát, a kombinált, 24 órás kezelés hatására a sejtek majdnem 30%-a tartózkodott a G2 fázisban. Ez az eredmény is egybeesik a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a M a G2 fázist gátolja [591,592], míg a R a sejtciklus G2/M átmenetet moduláló hatásával is részt vesz a R daganatellenes hatásának kialakításában [118,587].

Ezt követően a három szer hatását elemeztük az RRM2 expresszióra (69. ábra).



69. ábra – A különböző kezelések hatása az NCI-H295R sejtek RRM2 expressziójára – Az RRM2 mRNS expressziója a különböző kezelések hatására (A). Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. Az RRM2 fehérje expressziója a különböző kezelések hatására (B). K – kontroll, G – gemcitabin, M – mitotán, R – 9-cisz-retinsav.* $p < 0,05$. Ábra forrása: [518]

A gemcitabin – a kezelési időtől függetlenül – háromszorosára emelte az RRM2 mRNS szintjét NCI-H295R sejtekben és a 48 órás minták fehérjelizátumain végzett Western blot vizsgálatok igazolták a gemcitabin RRM2 expressziót fokozó hatását fehérjeszinten is.

Irodalomban korlátozott adatok érhetőek el az RRM család onkológiai kezelése során bekövetkező változásairól. Nakamura és munkatársainak korábbi eredménye szerint a kezelést megelőző magasabb RRM1 expresszió a gemcitabinra adott terápiás válasz korlátozottabb hatékonyságát vonja maga után az epeutak rosszindulatú daganatában [527]. Emellett, a kis interferáló RNS (small interfering RNA – siRNS) és miRNS mediálta RRM2-csökkentés visszaállítja a daganatok gemcitabin-szenzitivitását hasnyálmirigyrákban [593,594]. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a G kezelés következtében létrejövő RRM2 expresszió-fokozódás egy gemcitabinnal szemben kialakuló kemorezisztencia következménye. Ez magyarázhatja a G relatív hatástalanságát az ACC terápiájában [589].

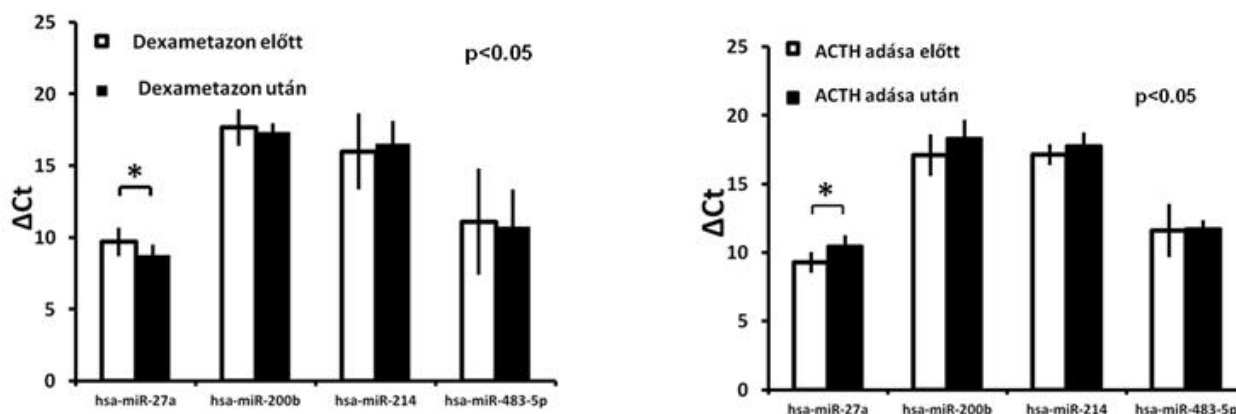
VI.2.13. *A keringésben jelen lévő mikro-RNS-ek mint biomarkerek a hormon-rendszer betegségeiben, a miR-483-5p a mellékvesekéreggrák specifikus markere*

A mellékvesekéreggrákban a miR-483-5p fokozott expressziója igazolódott, mind a daganatszövetekben az ép mellékvesékhez képest, mind pedig ACC-ben szenvedő betegek plazma mintáiban. Ezek az előzetes eredmények arra utaltak, hogy a miR-483-5p expressziót tumormarkerként lehetne hasznosítani a mellékvesekéreg carcinóma laboratóriumi diagnosztikájában. Mellékvese régióban kimutatott térfoglalás klinikai és laboratóriumi kivizsgálása során számos hormonmérésre, endokrin tesztre kerül sor. Nem állt rendelkezésünkre adat arra vonatkozóan, hogy ezek a mikro-RNS-ekre milyen hatással bírnak. Munkánk során egy előkísérletet végeztünk, amelynek az volt a célja, hogy megállapítsuk, hogy a keringésben az ACC markereként szereplő mikro-RNS-ek expresszióját befolyásolja a dexametazon teszt vagy az ACTH stimuláció. Összesen 20 betegből származó vérmintát dolgoztunk fel és megvizsgáltuk 5 kiválasztott mikro-RNS (*hsa-miR-27a*, *hsa-miR-200b*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-483-5p*, *hsa-miR-503*) expressziójának változását a két kezelés során. A mikro-RNS kiválasztásban figyelembe vettük a korábban egészséges egyéneken meghatározott mikro-RNS poolt valamint a saját ACC-ben meghatározott mikro-RNS méréseket is. Ezek közül a *hsa-miR-214*, a *hsa-miR-503* és a *hsa-miR-483-5p* ACC-ben a daganatok rosszindulatúságát jelző megváltozott kifejeződést mutató szöveti mikro-RNS biomarkerként jönnek szóba [99,117,595], és a *hsa-miR-483-5p* szintjét mellékvesekéreg karcinómában szenvedő betegek vérében magasabbnak találták [587,596,597]. A *miR-214* és a *miR-503* szöveti kifejeződésének csökkenése volt kimutatható ACTH hatására patkány modellben [598]. Két további mikro-RNS-ről igazolódott patkánymodellben, hogy kifejeződésük hormonkezelések hatására változik, mind a *hsa-miR-27a* mind a *hsa-miR-200b*

kifejeződése csökkent Dexametazon hatására, ugyanakkor az ACTH hatására a *hsa-miR-27a* szintje patkány mellékvesekéregben csökkent [598].

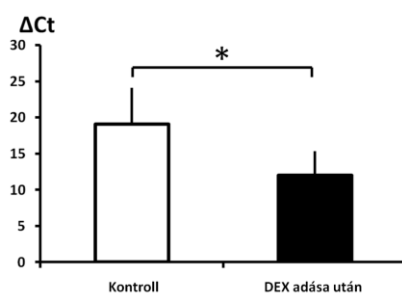
A kiválasztott mikro-RNS-ek közül összesen 4 mikro-RNS expressziója volt mérhető, amelyek közül egyedül a *miR-27a* mutatott szignifikáns változást mind a DEX mind az ACTH kezelést követően (70. ábra).

70 ábra: A keringésben jelen lévő mikro-RNS-ek expresszióinak változása Dexametazon (A) és ACTH (B) adása előtt és után.



A keringő *hsa-miR-27a* kifejeződése Dexametazon hatására nőtt, ACTH hatására pedig csökkent.

Annak megerősítésére, hogy a *hsa-miR-27a* keringésben igazolt változása esetlegesen mellékvesekéreg eredetű *in vitro* kísérleteket végeztünk humán, mellékvesekéreg H295R sejtvonalon. Dexametazon kezelést követően szignifikánsan nőtt a szekretált *hsa-miR-27a* kifejeződése a NCI-H295R sejtek tenyésztőfolyadékában



71. ábra: a szekretált *hsa-miR-27a* kifejeződése nő Dexametazon hatására *in vitro* az NCI-H295R sejtvonalon.

Mindezen eredményeink alapján a mellékvesekéreg rosszindulatú daganatában jelenleg legígéretesebb keringő mikro-RNS marker a *hsa-miR-483-5p* szintjét a fenti (diagnosztikai célból

széles körben alkalmazott) hormonkezelések nem befolyásolták, ami annak potenciális biomarkerként történő használhatóságát alátámasztja.

A keringő mikro-RNS-ek többek között a malignus daganatok diagnosztikája szempontjából ígéretes biomarkereknek számítanak. Kifejeződésüknek hormonális változásokra történő megváltozását néhány kutatás alátámasztja, pl. policisztás ovárium szindrómában szenvedő betegek szérumban négy mikro-RNS koncentrációja a szérumban szabad tesztoszteron szintjének változásával részben korrelációt mutatott [599].

Tudomásunk szerint a HPA tengelyt érintő hormonális változások és a keringő mikro-RNS-ek közötti összefüggést emberben, *in vivo* munkákat megelőzően még nem vizsgálták, így eredményeink ebből a szempontból is úttörőek.

A keringésben és *in vitro* Dexametazon hatására is fokozódó expressziót mutató *hsa-miR-27a* jelentőségének tisztázására további vizsgálatok szükségesek. A keringő mikro-RNS-ek celluláris eredete egyelőre még nem tisztázott, de a kifejeződés párhuzamos változásai azok részben mellékvesekéreg eredetét támasztják alá.

A *hsa-miR-27a* izmokban, angiogenezisben, adipogenezisben, elhízásban, gyulladásban, immunválaszban, lipid metabolizmusban, atherosclerosisban és metabolikus szindrómában betöltött szerepéről számos eredmény áll rendelkezésre [600]. A keringő *hsa-miR-27a* szerepe hipertrófiás kardiomiopátiában [601] és akut miokardiális infarktust követően a bal kamrai kontraktilitás potenciális biomarkereként is felmerült [602] és kifejeződését kissejtes tüdőrák esetén alacsonynak találták [603].

A glükokortikoidok hatásukat ezekben a szövetekben glükokortikoid receptoron keresztül fejtik ki. Dexametazon kezelés hatására a *NCI-H295R* mellékvesekéreg sejtvonalon a *hsa-miR-27a* kifejeződése változást mutatott, ezért feltételezhető, hogy ezen mikro-RNS szabályozása is a glükokortikoid receptoron keresztül történik. Mivel a *hsa-miR-27a* transzkripciója az RNS polimeráz II-n keresztül megy végbe [604] érdekes lenne annak vizsgálata, hogy egy funkcionális glükokortikoid válasz elem jelen van-e a *hsa-miR-27a* promoterében (*in silico* predikciónk szerint, a glükokortikoid válaszra specifikus DNS szakasz a *hsa-miR-27a* promoterben megtalálható).

A *hsa-miR-27a*-ról kimutatták, hogy az izmok kifejlődésében és sorvadásában jelentős szerepet játszó myostatin expresszióját csökkenti. A myostatin emelkedett expresszióját az izomtömeg csökkenésével hozták összefüggésbe [605]. Úgy tűnik, hogy a *miR-27a* és a myostatin egy önszabályozó körben vesznek részt, ugyanis egér modellen a myostatin növeli a *miR-27a* kifejeződését a *SMAD3*-on keresztül, és válaszul a *miR-27a* gátolja a myostatin kifejeződését (McFarlane és mtsai 2014). Tekintettel arra, hogy a glükokortikoidok gátolják a *SMAD3* transzkripciók aktiválását [606], a beadott Dexametazon a myostatin-*SMAD3-miR-27a* szabályozó köbe több ponton bekapcsolódhat.

A keringő *hsa-miR-27a* ACTH által indukált csökkenése szerepet játszhat az ACTH-dependens Cushing szindrómában. A *miR-27a* myostatinra gyakorolt hatása a fenti mechanizmuson keresztül a hiperkortizolizmusra jellemző, glükokortikoid által indukált izomsorvadást magyarázhatja.

A keringő *hsa-miR-27a* szintjét a 2. típusú cukorbetegséggel is összefüggésbe hozták, illetve az éhomi vércukorértékek fenntartásában is szerepet játszhat [607]. Tekintettel arra, hogy a glükokortikoidok szerepe az inzulirezisztencia patogenezisében ismert [608], ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *hsa-miR-27a* kifejeződésében az ACTH és a glükokortikoidok által bekövetkezett változások számos más kórkép patogenezisében is szerepet kaphatnak, mindenekelőtt hyperkortizolizmus esetében, de ezen változások kórlélettani jelentőségének tisztázásához további vizsgálatokra lesz szükség

4.2.14. *Menin* expresszió és a *MEN1* 3'UTR célzó mikroRNS-ek szerepe mellékpajzsmirigy daganatokban

A *MEN1* szindrómához társuló elváltozások kialakulása a knudsoni két ütés teória alapján történik [19]. Ez alapján a *MEN1* szindrómához társuló tumorokban a betegekből eltávolított daganatokban mind a két allél mutált, vagy csak az öröklött hibás allél detektálható. Familiáris esetekben az érintettek autoszómális domináns úton örökölnék egy csírasejtes mutációt, ami önmagában nem felelős a daganatok kialakulásáért. Ez csak akkor következik be, amikor szomatikus mutáció következtében a másik allél is elvesztődik (LOH), mutálódik, vagy epigenetikai úton csendesedik.

A *MEN1* gén mutációinak jelentőségét HPT-ban az adja, hogy ezekben a daganatokban is a leggyakrabban mutálódott gén az új generációs szekvenálási módszerekkel vizsgálva is ezeket a szöveteket [609,610].

Ugyanakkor a *menin* fehérje expressziójáról HPT-ban csak egyetlen tanulmány számolt be. Az epigenetikai eltérések közül DNS metiláció ritkán fordul elő mellékpajzsmirigy adenómákban, de a mikro-RNS-ek általi szabályozást több tanulmány is felvetette.

Munkánk célja az volt, hogy a *MEN1*-asszociált és sporadikus HPT szövetekben elemezzük a *MEN1* gén mutációkat, a *menin* és a *MEN1* 3'UTR-t célzó mikro-RNS-ek expresszióját. Összesen 56 szövetet dolgoztunk fel. 16 esetben csírasejtes *MEN1* mutációt, 7 esetben pedig szomatikus *MEN1* mutációt detektáltunk (39. táblázat).

39. táblázat: MEN1-asszociált és sporadikus HPT szövetek klinikai és patológiai jellegzetességei

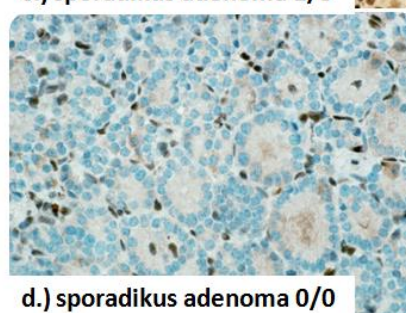
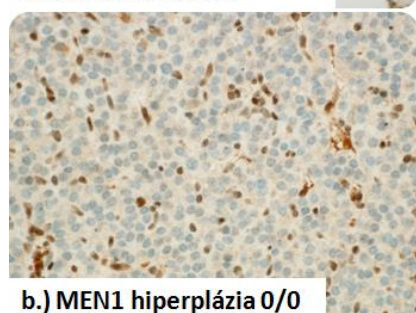
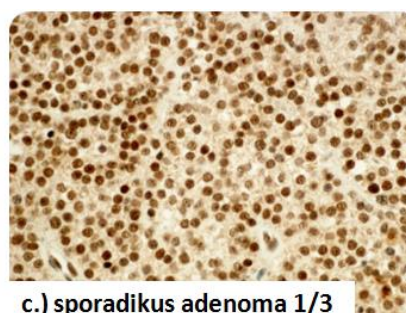
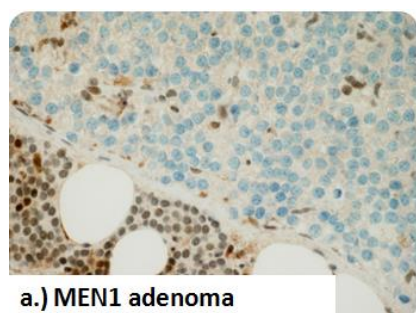
Beteg	Nem	Életkor	MEN-1 vagy sporadikus	Szövettan	menin immunohistokémia		MEN1 mutáció		
					Citoplazma	Sejtmag		Csírsejtes vagy szomatikus	Mutáció típusa
M1	F	18	MEN-1	adenoma	0	0	E8: c.1160delA*	germline	frameshift deletion
	F	22	MEN-1	adenoma	1	0	E8: c.1160delA*	germline	frameshift deletion
M2	F	47	MEN-1	adenoma	1	0	E6: c.902C>G, p.Leu301Arg	germline	missense
M3	F	46	MEN-1	adenoma	0	0	E6: c.902C>G, p.Leu301Arg	germline	missense
	F	52	MEN-1	adenoma	0	0	E6: c.902C>G, p.Leu301Arg	germline	missense
M4	F	26	MEN-1	adenoma	0	0	E10: c.1547_1548insC	germline	frameshift insertion
M5	F	29	MEN-1	adenoma	1	0	E10: c.1547_1548insC	germline	frameshift insertion
M6	F	56	MEN-1	adenoma	1	0	E2: c.358_360delAAG	germline	in-frame deletion
M7	F	33	MEN-1	hyperplasia	2	0	E2: c.231C>A, p.Tyr77STOP	germline	nonsense
M8	M	20	MEN-1	hyperplasia	1	0	E2: c.249_252delGTCT	germline	frameshift deletion
M9	M	57	MEN-1	hyperplasia	1	0	E2: c.202_206dupGCCCC (5bp)	germline	frameshift insertion
M10	F	28	MEN-1	hyperplasia	0	0	E8: c.1062C>A, p.Cys354STOP	germline	nonsense
M11	F	20	MEN-1	adenoma	1	0	E4: c.668T>C, p.Leu223Pro	germline	missense
M12	F	23	MEN-1	adenoma	0	0	E2: c.168delC*	germline	frameshift deletion
M13	F	53	MEN-1	hyperplasia	1	0	E9: c.1177C>T, p.Gln393Stop	germline	nonsense
M14	M	28	MEN-1	adenoma	1	0	I9: c.1351-2A>C	germline	splice site mutation
P1	F	68	sporadikus	adenoma	1	0	E2: c.384 delC	somatic	frameshift deletion
P2	F	54	Sporadikus	adenoma	0	0	wild type		
P3	M	36	sporadikus	adenoma	0	0	E10: c.1381 C>T p.Arg461Cys	somatic	missense
P4	F	46	sporadikus	adenoma	0	0	E3: c.511C>T p.Gln171Stop	somatic	nonsense
P5	F	51	sporadikus	adenoma	2	0	wild type		
P6	F	42	sporadikus	adenoma	0	0	E9: c.1258 C>T p.Arg420Stop	somatic	nonsense
P7	M	40	sporadikus	adenoma	0	0	wild type		
P8	M	62	sporadikus	adenoma	1	0	E6: c.848delT	somatic	frameshift deletion
P9	F	52	sporadikus	hyperplasia	1	0	E4: c.681insT	somatic	frameshift insertion
P10	F	43	sporadikus	hyperplasia	1	0	E2: c.125 G>C p.Gly42Ala	somatic	missense
P11	F	64	sporadikus	hyperplasia	0	0	wild type		
P12	F	74	sporadikus	adenoma	1	2	wild type		
P13	M	43	sporadikus	adenoma	1	3	wild type		
P14	F	71	sporadikus	adenoma	1	1	E2: c.46_148del102nt p.16_50del34codon	somatic	in-frame deletion
P15	M	32	sporadikus	adenoma	1	1	wild type		
P16	F	29	sporadikus	adenoma	1	2	wild type		
P17	M	21	sporadikus	adenoma	1	2	wild type		
P18	M	52	sporadikus	adenoma	0	2	wild type		
P19	F	23	sporadikus	adenoma	1	3	wild type		
P20	F	47	sporadikus	adenoma	0	2	wild type		
P21	F	53	sporadikus	adenoma	0	1	wild type		
P22	F	21	sporadikus	adenoma	0	2	wild type		
P23	F	62	sporadikus	adenoma	0	2	wild type		
P24	F	63	sporadikus	adenoma	0	2	wild type		
P25	F	73	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type		
P26	F	70	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type		
P27	F	64	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type		
P28	F	64	sporadikus	hyperplasia	1	2	wild type		
P29	F	69	sporadikus	hyperplasia	2	2	wild type		
P30	F	55	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type		
P31	F	51	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type		

P32	F	41	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type
P33	F	66	sporadikus	hyperplasia	1	3	wild type
P34	F	80	sporadikus	hyperplasia	0	3	wild type
P35	F	66	sporadikus	hyperplasia	0	1	E9: c.1288G>A p.Glu425Lys somatic missense
P36	F	62	sporadikus	hyperplasia	0	1	E9: c. 1363 C>T p.Gln450STOP somatic nonsense
P37	F	52	sporadikus	hyperplasia	0	2	wild type
P38	F	56	sporadikus	hyperplasia	0	2	wild type
P39	F	58	sporadikus	hyperplasia	0	1	wild type
P40	F	77	sporadikus	hyperplasia	1	2	wild type

*: új, az irodalomban még nem közölt mutációk

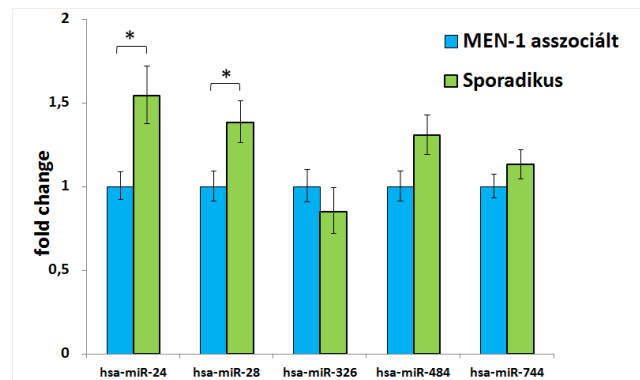
A demográfiai adatok közül egyedül az életkorban találtunk szignifikáns különbséget, a MEN1-asszociált HPT fiatalabb életkorban jelentkezett mint a sporadikus HPT.

Elvégeztük amenin immunhisztokémia festését is, ami az összes MEN1-asszociált és 11 sporadikus HPT-ban mutatott negative sejtmagi festődést (38. táblázat és 72. ábra).



72. Ábra: Magi menin expresszió MEN1-asszociált és sporadikus HPT adenómákban immunhisztokémiai vizsgálattal: a.) Menin-negatív MEN-1 asszociált adenóma b.) Menin-negatív MEN-1 asszociált hiperplázia c.) Sporadikus erős magi menin festődét mutató adenóma d.) Sporadikus menin-negatív adenoma, [611].

A *MEN1* 3'UTR-t célzó hat mikro-RNS közül a hsa-miR-24 és hsa-miR-28 expressziója magasabb volt a sporadikus, nem-szindrómás esetekben a MEN1-hez társult esetekhez viszonyítva (73. ábra).



73. ábra A MEN1-asszociált és a sporadikus HPT minták mikro-RNS expressziójának összehasonlítása: Szignifikáns a különbség a miR-24 és a miR-28 expressziójában látható (Student-f. kétmintás T-próba; $p < 0,05$).

Kutatómunkánk során elvégeztük a *MEN1* gén és a menin fehérje vizsgálatát MEN1-asszociált és sporadikus HPT szövetekben. A menin fehérje összehasonlító vizsgálatát HPT-ban mindezidáig nem végezték el. Ahogyan az várható volt a MEN1-asszociált daganatok mindegyikében negatív volt a menin sejtmagi festődése. A sporadikus HPT szövetek 27.5%-ában szintén negatív menin festődést mutattunk ki, de ezek közül a daganatok közül csak 4 esetben találtunk MEN1 mutációt. A másik 3 *MEN1* mutációt olyan sporadikus HPT-ben találtuk, amelyek menin festődést is mutattak. Ennek egyik oka lehet, hogy az aminosavcserével járó mutációk nem érintik az eredeti fehérjében azt az epitópot, ami ellen az antitest készült így a kötődését nem befolyásolja. A menin negatív esetekben hiányzó *MEN1* mutáció oka legvalószínűbben a *MEN1* gén nagy deléciója. Sajnos ennek vizsgálatára az FFPE mintákból izolált, többnyire fragmentált DNS nem alkalmas. Adatainkat összesítve az általunk alkalmazott menin antitest diagnosztikai specificitása 82.6%, szenzitivitása pedig 89.7% volt. A menin festődésnek diagnosztikai és prognosztikai szerepe is lehet. Neuroendokrin daganatokban [612] és mtsai igazolták, hogy mind a *MEN1* mutációk jelenléte mind pedig a csökkent menin festődés rossz prognózissal társult tüdő karcinoidokban.

A mikro-RNS expresszió meghatározásával a hsa-miR-24 és hsa-miR-28 szintje emelkedettebb volt sporadikus HPT-ben a MEN1-asszociált daganatokhoz képest, de nem mutatott összefüggést a menin festődéssel. A többi vizsgált mikro-RNS expresszió nem különbözött a két csoportban.

A *MEN1* 3'UTR és a hsa-miR-24 között a fizikai interakció már bizonyított [613,614] és feltételezhetjük, hogy ez a mikro-RNS a hsa-miR-28-cal együtt a sporadikus HPT-ben a menin csendesítéshez hozzájárul. Azonban az is ismert, endokrin hasnyálmirigyben, hogy a menin stimulálja a hsa-miR-24 expresszióját. A csírasejtes *MEN1* mutációt hordozók minden sejtjében egy

csökkentebb *menin* expresszió várható, ami magyarázhatja a familiáris esetekben a *hsa-miR-24* csökkentebb expresszióját.

Összegezve eredményeinket igazoltuk a *MEN1* mutációk jelenlétét sporadikus HPT-k 27.5%-ában és a sejtmagi *menin* festődés hiánya megerősíti a *menin* szerepét a *MEN1* szindrómához társult mellékpajzsmirigy daganatokban. A *hsa-miR-24* és *hsa-miR-28* sporadikus HPT-ban szerepet játszhat a *MEN1* csendesítésében.

VI. A LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Genetika Laboratóriumában elérhetővé tettük a legtöbb monogénesen öröklődő endokrin tumorszindrómáért felelős gén molekuláris biológiai vizsgálatát. A hagyományos DNS szekvenálás mellett szükséges volt kidolgozni és bevezetni olyan bonyolultabb módszereket (long PCR, MLPA) is, amelyek szükségesek voltak a tumorszupresszor gének heterozigóta (hemizigócia) formában előforduló deléciói kimutatására, vagy pl. a több kópiaszám variációt mutató *CYP21A2* gén teljes genotipizálásához.
2. MEN2 szindrómában kimutattuk a patogén *RET* mutációkat, a genotípus-fenotípus összefüggések alapján egyénre szabott diagnosztikai és terápiás beavatkozásokat, valamint preventív pajzsmirigy műtéteket javasoltunk.
3. Feltérképeztük és genetikailag jellemeztük a hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegeket. Az MLPA vizsgálat bevezetésével új, addig genetikailag negatív eseteket azonosítottunk.
4. A *VHL* gén Ser80Ile mutációjáról kimutattuk, hogy patogén eltérés.
5. Az örökletes phaeochromocytóma/paraganglióma szindrómák háttérében álló mutációs spektrum azonosítása révén, elsőként azonosítottunk hazai betegben extraadrenalis PGL háttérében *SDHD* mutációt, és elsőként igazoltuk, hogy az *SDHD* gén G12S polimorfizmusa gyakoribb előfordulása MEN2A szindrómában, mint egyéb *RET* génhibákhoz társuló kórképekben.
6. Elsőként írtunk le egy beteget, aki csírasejtes *PTEN* és *SDHC* mutációt hordozott.
7. Cowden és Cowden szerű betegségben előfordulnak *SDHx* génvariánsok, amelyeknek szerepe lehet a fenotípus módosításában. Az *SDHx* variánsokhoz több féle patomechanizmus is társulhat.
8. A MEN1 szindróma szerv-specifikus manifesztációit és a menin fehérje funkcióit összegeztük. A mellékvese daganatok kialakulásában csekély szerepe van a *MEN1* mutációknak.
9. A *RET* 11-es exonjának TGC634TGG mutáció prognosztikai szerepét tisztáztuk.
10. A *RET* 10-es exon mutációkra mutáció-specifikus diagnosztikai, terápiás és prognosztikai javaslatokat fogalmaztunk meg.
11. Gyermekkori phaeochromocytómák és paragangliómák esetében is előfordulnak örökletes génhibák, a legrosszabb indulatú daganat *SDHB* mutációk esetén várható.
12. MEN2 szindrómában kialakuló phaeochromocytómák esetében a daganat eltávolítása a mellékvesekéreg-megtartásával javasolt.

13. A GR N363S polimorfizmusa a szénhidrát anyagcserén keresztül szerepet játszik a kétoldali, hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenómák patogenézisében.
14. Új módszert dolgoztunk ki a GR BclI polimorfizmus kimutatására.
15. A CYP21A2 gén vizsgálatára új metodikát dolgoztunk ki.
16. A C4B*Q0 kópiaszámváltozás és a CYP21A2 gén haplotípusai összefüggés mutatnak az ACTH stimulációra adott mellékvesekéreg hormontermelésével.
17. A glükokortikoid receptor izoformái expresszálódnak a mellékvesekéreg hormontermelő daganataiban. A GR β expresszió a kortizolt termelő adenómákban volt a legmagasabb.
18. Létrehoztunk egy bélhámsejt-tenyészetet, ami fokozottan expresszálja a GR β izoformáját.
19. Kimutattuk, hogy a GR β a GR α általi géntranszkripciót gátolja, de önálló transzkripciós hatással is rendelkezik.
20. Gyulladásos bélbetegségben a GR β olyan gének expresszióját szabályozza, amelyeknek a sejt-sejt interakcióban van elsődleges szerepe.
21. A mellékvesekéregben a napszaki ritmusért felelős óragéneknek önálló ritmikus expressziója van, így a humán H295R sejtvonal alkalmas a napszaki ingadozással kapcsolatos kísérletek *in vitro* modellezésére.
22. A mikro-RNS expresszió teljes genom szintű meghatározásához és az eltérések biológiai relevanciáinak megértése csak a különböző platformokról származó adatok integrálásával képzelhető el.
23. A NFPA és ép hipofízis szövetekben az eltérő mértékben expresszálódó mikro-RNS-ek útvonalanalízisével igazoltuk a TGF β jelátviteli út érintettségét ezekben a daganatokban.
24. Kimutattuk, hogy a hormonálisan inaktív hipofízis daganatokban a WEE1-nek és az őt célzó mikro-RNS-eknek jelentős szerepe van a daganatok patogenézisében. Bebizonyítottuk, hogy a WEE1 3' UTR régióját a hipofízis daganatokban fokozott expressziót mutató miR-128a, miR-516a-3p és miR-155 célozzák.
25. A CDC25A és CDC25C fokozottan expresszálódik NFPA daganatokban az ép hipofízis szövetekhez képest. Az őket célzó mikro-RNS-ek expressziója csökken a daganatokban, ami tumorsuppresszor hatásukra utal.
26. Fluoreszcens festéssel jelölt áramlási citometriás módszert dolgoztunk ki a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek elválasztására.
27. A sejtciklus progressziója során dinamikus génexpressziót, de stabil mikro-RNS expressziót tapasztaltunk, három különböző sejtípus esetén.
28. A sejtciklus-dependens expressziót mutató RRM2 proliferációs markerként szerepelhet mellékvesekéreg carcinómában.

29. A mellékvesekéregregrákra specifikus keringő miR-483-5p vérben mérhető koncentrációját nem befolyásolják a dinamikus endokrin tesztek, így tumormarkerként történő alkalmazása ígéretesnek tűnik.
30. A *menin* sejtmagi hiánya jellemző a MEN1 szindrómához társult mellékpajzsmirigy adenómákban és a sporadikus esetek mintegy 27.5 %-ára. Ennek leggyakoribb oka a *MEN1* gén mutációja. A *MEN1* 3'UTR-t célzó hsa-miR-24 és hsa-miR-28 expressziója a MEN1-hez társult daganatokban kisebb, mint a sporadikus esetekben.

Irodalomjegyzék

1. Burgess JR, Greenaway TM, Shepherd JJ. Expression of the MEN-1 gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *J. Intern. Med.* 1998;243:465–70.
2. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:5658–71.
3. Roijers JF, de Wit MJ, van der Luijt RB, Ploos van Amstel HK, Höppener JW, Lips CJ. Criteria for mutation analysis in MEN 1-suspected patients: MEN 1 case-finding. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000;30:487–92.
4. Arnold A. Approach to therapy in multiple endocrine type 1. *Endocrinol. UpToDate* [Internet]. Rose BB. Wellesley, Ma, USA: UpToDate Inc; 1999 [cited 2017 Jul 18]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/multiple-endocrine-neoplasia-type-1-clinical-manifestations-and-diagnosis>
5. Stratakis CA, Ball DW. A concise genetic and clinical guide to multiple endocrine neoplasias and related syndromes. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM.* 2000;13:457–65.
6. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL, Spiegel AM, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 2001;12:173–8.
7. Tsukada T, Yamaguchi K, Kameya T. The MEN1 gene and associated diseases: an update. *Endocr. Pathol.* 2001;12:259–73.
8. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, et al. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84:216–9.
9. Pannett AA, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr. Relat. Cancer.* 1999;6:449–73.
10. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. *Annu. Rev. Physiol.* 2000;62:377–411.
11. Kouvaraki MA, Lee JE, Shapiro SE, Gagel RF, Sherman SI, Sellin RV, et al. Genotype-phenotype analysis in multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960. 2002;137:641–7.
12. Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, et al. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1169–75.
13. Kawamura J, Shimada Y, Komoto I, Okamoto H, Itami A, Doi R, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene mutations in sporadic gastrinomas in Japan. *Oncol. Rep.* 2005;14:47–52.
14. Libé R, Bertherat J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur. J. Endocrinol.* 2005;153:477–87.
15. Miedlich S, Krohn K, Lamesch P, Müller A, Paschke R. Frequency of somatic MEN1 gene mutations in monoclonal parathyroid tumours of patients with primary hyperparathyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* 2000;143:47–54.

16. Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, Edgemon KA, et al. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:1118–23.
17. Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ, Goltzman D, Hendy GN. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:3837–42.
18. Yazgan O, Pfarr CM. Differential binding of the Menin tumor suppressor protein to JunD isoforms. *Cancer Res.* 2001;61:916–20.
19. Ikeo Y, Yumita W, Sakurai A, Hashizume K. JunD-menin interaction regulates c-Jun-mediated AP-1 transactivation. *Endocr. J.* 2004;51:333–42.
20. Poisson A, Zablewska B, Gaudray P. Menin interacting proteins as clues toward the understanding of multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Lett.* 2003;189:1–10.
21. Lemmens IH, Forsberg L, Pannett AA, Meyen E, Piehl F, Turner JJ, et al. Menin interacts directly with the homeobox-containing protein Pem. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;286:426–31.
22. Huang SC, Zhuang Z, Weil RJ, Pack S, Wang C, Krutzsch HC, et al. Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin. *Lab Invest.* 1999;79:301–10.
23. Lopez-Egido J, Cunningham J, Berg M, Oberg K, Bongcam-Rudloff E, Gobl A. Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the intermediate filament network in regulating menin activity. *Exp. Cell Res.* 2002;278:175–83.
24. Wautot V, Khodaei S, Frappart L, Buisson N, Baro E, Lenoir GM, et al. Expression analysis of endogenous menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, in cell lines and human tissues. *Int. J. Cancer.* 2000;85:877–81.
25. Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T, Yamaguchi K. Menin, the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, exhibits GTP-hydrolyzing activity in the presence of the tumor metastasis suppressor nm23. *J. Biol. Chem.* 2002;277:38197–204.
26. Sukhodolets KE, Hickman AB, Agarwal SK, Sukhodolets MV, Obungu VH, Novotny EA, et al. The 32-kilodalton subunit of replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:493–509.
27. Jin S, Mao H, Schnepf RW, Sykes SM, Silva AC, D'Andrea AD, et al. Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage. *Cancer Res.* 2003;63:4204–10.
28. Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, et al. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:749–54.
29. La P, Silva AC, Hou Z, Wang H, Schnepf RW, Yan N, et al. Direct binding of DNA by tumor suppressor menin. *J. Biol. Chem.* 2004;279:49045–54.
30. Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, et al. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:14659–64.

31. Ratineau C, Bernard C, Poncet G, Blanc M, Josso C, Fontanière S, et al. Reduction of menin expression enhances cell proliferation and is tumorigenic in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279:24477–84.
32. Schnepf RW, Hou Z, Wang H, Petersen C, Silva A, Masai H, et al. Functional interaction between tumor suppressor menin and activator of S-phase kinase. *Cancer Res.* 2004;64:6791–6.
33. Agarwal SK, Lee Burns A, Sukhodolets KE, Kennedy PA, Obungu VH, Hickman AB, et al. Molecular pathology of the MEN1 gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1014:189–98.
34. Hendy GN, Kaji H, Sowa H, Lebrun J-J, Canaff L. Menin and TGF-beta superfamily member signaling via the Smad pathway in pituitary, parathyroid and osteoblast. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 2005;37:375–9.
35. Sowa H, Kaji H, Canaff L, Hendy GN, Tsukamoto T, Yamaguchi T, et al. Inactivation of menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, inhibits the commitment of multipotential mesenchymal stem cells into the osteoblast lineage. *J. Biol. Chem.* 2003;278:21058–69.
36. Sizemore G. Multiple endocrine neoplasia. *Princ. Endocrinol. Metab.* Becker K.I. Philadelphia: Lippincott Company; 1995. p. 1555–63.
37. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA.* 1996;276:1575–9.
38. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature.* 1994;367:375–6.
39. Koch CA, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Brouwers FM, Pacak K. New insights into the genetics of familial chromaffin cell tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;970:11–28.
40. Pomares FJ, Cañas R, Rodriguez JM, Hernandez AM, Parrilla P, Tebar FJ. Differences between sporadic and multiple endocrine neoplasia type 2A pheochromocytoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 1998;48:195–200.
41. Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, Li ST, Bornstein SR, Vortmeyer A, et al. Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:1999–2008.
42. Uchino S, Noguchi S, Sato M, Adachi M, Yamashita H, Watanabe S, et al. Presymptomatic detection and treatment of Japanese carriers of the multiple endocrine neoplasia type 2A gene. *Surg. Today.* 1999;29:862–7.
43. Takahashi M, Cooper GM. ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 1987;7:1378–85.
44. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene.* 1988;3:571–8.

45. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993;363:458–60.
46. Capes-Davis A. Return of the native: deducing the normal function of the RET proto-oncogene. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab.* 1999;61–9.
47. Vega QC, Worby CA, Lechner MS, Dixon JE, Dressler GR. Glial cell line-derived neurotrophic factor activates the receptor tyrosine kinase RET and promotes kidney morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93:10657–61.
48. Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisén J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996;382:70–3.
49. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996;382:73–6.
50. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartowaara K, Suvanto P, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*. 1996;381:789–93.
51. Creedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, Osborne PA, Lampe PA, Fahrner TJ, et al. Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94:7018–23.
52. Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996;382:76–9.
53. Borrego S, Sáez ME, Ruiz A, Gimm O, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J. Med. Genet.* 1999;36:771–4.
54. Kondo K, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp. Cell Res.* 2001;264:117–25.
55. Eng C, Crossey PA, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Prowse A, et al. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J. Med. Genet.* 1995;32:934–7.
56. Neumann HPH, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:1459–66.
57. Mulligan LM, Ponder BA. Genetic basis of endocrine disease: multiple endocrine neoplasia type 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80:1989–95.
58. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat. Genet.* 1994;6:70–4.
59. Cote GJ, Wohllk N, Evans D, Goepfert H, Gagel RF. RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;9:609–30.
60. Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, Seri M, Silengo M, Tocco T, et al. RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene*. 1995;10:2415–9.

61. Nilsson O, Tisell LE, Jansson S, Ahlman H, Gimm O, Eng C. Adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas in a family with germline RET V804L mutation. *JAMA*. 1999;281:1587–8.
62. Januszewicz A, Neumann HP, Loń I, Szmigielski C, Symonides B, Kabat M, et al. Incidence and clinical relevance of RET proto-oncogene germline mutations in pheochromocytoma patients. *J. Hypertens*. 2000;18:1019–23.
63. Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene*. 1999;18:1369–73.
64. Neumann HPH, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med*. 2002;346:1459–66.
65. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, et al. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum. Mutat*. 1996;8:348–57.
66. Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 1993;260:1317–20.
67. Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum. Mutat*. 1995;5:66–75.
68. Maher ER, Webster AR, Richards FM, Green JS, Crossey PA, Payne SJ, et al. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J. Med. Genet*. 1996;33:328–32.
69. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet Lond. Engl*. 2003;361:2059–67.
70. Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene*. 1999;18:1529–35.
71. Gao J, Naglich JG, Laidlaw J, Whaley JM, Seizinger BR, Kley N. Cloning and characterization of a mouse gene with homology to the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: implications for the potential organization of the human von Hippel-Lindau disease gene. *Cancer Res*. 1995;55:743–7.
72. Stebbins CE, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*. 1999;284:455–61.
73. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, et al. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol. Cell. Biol*. 1998;18:732–41.
74. Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD. A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1998;95:8817–22.

75. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 2000;19:4298–309.
76. van der Harst E, de Krijger RR, Dinjens WN, Weeks LE, Bonjer HJ, Bruining HA, et al. Germline mutations in the vhl gene in patients presenting with pheochromocytomas. *Int. J. Cancer.* 1998;77:337–40.
77. Li C, Weber G, Ekman P, Lagercrantz J, Norlen BJ, Akerström G, et al. Germline mutations detected in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene by Southern blot and direct genomic DNA sequencing. *Hum. Mutat.* 1998;Suppl 1:S31–3.
78. Olschwang S, Richard S, Boisson C, Giraud S, Laurent-Puig P, Resche F, et al. Germline mutation profile of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. *Hum. Mutat.* 1998;12:424–30.
79. Dollfus H, Massin P, Taupin P, Nemeth C, Amara S, Giraud S, et al. Retinal hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;43:3067–74.
80. Cascon A. Mutational analysis of complex II genes (SDHB, SDHC and SDHD) in Spanish patients with pheochromocytoma and/or paraganglioma. *Cancer Detect Prev.* 2002;S66.
81. Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo A-P, Grebe SKG, Murad MH, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99:1915–42.
82. Niemann S, Müller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat. Genet.* 2000;26:268–70.
83. Dahia PLM, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M, et al. A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet.* 2005;1:72–80.
84. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1857:1086–101.
85. Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. *J. Natl. Cancer Inst.* 2013;105:1607–16.
86. Zbuk KM, Eng C. Cancer phenomics: RET and PTEN as illustrative models. *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7:35–45.
87. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 1997;15:356–62.
88. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 1997;57:2124–9.
89. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum. Mutat.* 2003;22:183–98.

90. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, et al. Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J. Med. Genet.* 1998;35:881–5.
91. Zhou X-P, Waite KA, Pilarski R, Hampel H, Fernandez MJ, Bos C, et al. Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in aberrant PTEN protein and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;73:404–11.
92. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, et al. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1999;8:1461–72.
93. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:4551–64.
94. Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Van der Zwan JM, Dieleman J, Kerstens MN, Links TP, et al. Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. *Eur J Cancer.* 2013;49:2579–86.
95. Custodio G, Komechen H, Figueiredo FR, Fachin ND, Pianovski MA, Figueiredo BC. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351:44–51.
96. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med.* 1990;322:1195–201.
97. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:2650–5.
98. Papotti M, Libe R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer.* 2011;2:333–40.
99. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist.* 2008;13:548–61.
100. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71:747–52.
101. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:606–11.
102. Nystrom A, Cheetham JE, Engstrom W, Schofield PN. Molecular analysis of patients with Wiedemann-Beckwith syndrome. II. Paternally derived disomies of chromosome 11. *Eur J Pediatr.* 1992;151:511–4.
103. Else T. Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351:66–70.
104. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 2003;94:225–9.

105. Ross JS, Wang K, Rand JV, Gay L, Presta MJ, Sheehan CE, et al. Next-generation sequencing of adrenocortical carcinoma reveals new routes to targeted therapies. *J Clin Pathol*. 2014;67:968–73.
106. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46:607–12.
107. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2005;65:7622–7.
108. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, et al. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E419–26.
109. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *Am J Pathol*. 2012;181:1017–33.
110. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:11–26.
111. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:1444–53.
112. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, Thomas DG, et al. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:204–12.
113. De Martino MC, van Koetsveld PM, Feelders RA, Sprij-Mooij D, Waaijers M, Lamberts SW, et al. The role of mTOR inhibitors in the inhibition of growth and cortisol secretion in human adrenocortical carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19:351–64.
114. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2015;16:426–35.
115. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*. 2009;27:1108–15.
116. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res*. 2009;15:668–76.
117. Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16:895–906.

118. Szabo PM, Tamasi V, Molnar V, Andrasfalvy M, Tombol Z, Farkas R, et al. Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene*. 2010;29:3163–72.
119. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr. Rev.* 1995;16:460–84.
120. Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Alí A, Piovesan A, et al. Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;79:1532–9.
121. Sereg M, Szappanos A, Toke J, Karlinger K, Feldman K, Kaszper E, et al. Atherosclerotic risk factors and complications in patients with non-functioning adrenal adenomas treated with or without adrenalectomy: a long-term follow-up study. *Eur. J. Endocrinol.* 2009;160:647–55.
122. Hedeland H, Ostberg G, Hökfelt B. On the prevalence of adrenocortical adenomas in an autopsy material in relation to hypertension and diabetes. *Acta Med. Scand.* 1968;184:211–4.
123. Terzolo M, Osella G, Alì A, Borretta G, Magro GP, Termine A, et al. Different patterns of steroid secretion in patients with adrenal incidentaloma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:740–4.
124. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Alì A, et al. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85:637–44.
125. Tauchmanová L, Rossi R, Biondi B, Pulcrano M, Nuzzo V, Palmieri E-A, et al. Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:4872–8.
126. Reincke M, Fassnacht M, Vähä S, Mora P, Allolio B. Adrenal incidentalomas: a manifestation of the metabolic syndrome? *Endocr. Res.* 1996;22:757–61.
127. Patócs A, Tóth M, Barta C, Sasvári-Székely M, Varga I, Szücs N, et al. Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas. *Eur. J. Endocrinol.* 2002;147:349–55.
128. Baumgartner-Parzer SM, Pauschenwein S, Waldhäusl W, Pölzler K, Nowotny P, Vierhapper H. Increased prevalence of heterozygous 21-OH germline mutations in patients with adrenal incidentalomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2002;56:811–6.
129. Bernini GP, Brogi G, Vivaldi MS, Argenio GF, Sgrò M, Moretti A, et al. 17-Hydroxyprogesterone response to ACTH in bilateral and monolateral adrenal incidentalomas. *J. Endocrinol. Invest.* 1996;19:745–52.
130. Koch CA, Pacak K, Chrousos GP. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:5367–84.
131. Del Monte P, Bernasconi D, Bertolazzi L, Meozzi M, Badaracco B, Torre R, et al. Increased 17 alpha-hydroxyprogesterone response to ACTH in silent adrenal adenoma: cause or effect? *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 1995;42:273–7.
132. Seppel T, Schlaghecke R. Augmented 17 alpha-hydroxyprogesterone response to ACTH stimulation as evidence of decreased 21-hydroxylase activity in patients with incidentally discovered adrenal tumours ('incidentalomas'). *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 1994;41:445–51.

133. Turton DB, O'Brian JT, Shakir KM. Incidental adrenal nodules: association with exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to adrenocorticotrophic hormone. *J. Endocrinol. Invest.* 1992;15:789–96.
134. Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R. Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992;74:685–9.
135. Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, et al. Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:2585–8.
136. Ambrosi B, Dall'Asta C, Barbetta L, Libé R. Activities of 21-hydroxylase, 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase. *Eur. J. Endocrinol.* 2000;142:411–2.
137. Kjellman M, Holst M, Bäckdahl M, Larsson C, Farnebo LO, Wedell A. No overrepresentation of congenital adrenal hyperplasia in patients with adrenocortical tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 1999;50:343–6.
138. Rácz K, Pinet F, Marton T, Szende B, Gláz E, Corvol P. Expression of steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids and corticosteroid production in aldosterone-producing and “nonfunctioning” adrenal adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;77:677–82.
139. Reincke M. Mutations in adrenocortical tumors. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 1998;30:447–55.
140. Szappanos Á, Nagy Z, Kovács B, Poór G, Tóth M, Rácz K, et al. Tissue-specific glucocorticoid signaling may determine the resistance against glucocorticoids in autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* 2015;22:1126–35.
141. Katahira M, Knegtel RM, Boelens R, Eib D, Schilthuis JG, van der Saag PT, et al. Homo- and heteronuclear NMR studies of the human retinoic acid receptor beta DNA-binding domain: sequential assignments and identification of secondary structure elements. *Biochemistry (Mosc.)*. 1992;31:6474–80.
142. Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, et al. The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2005;19:52–64.
143. Riml S, Schmidt S, Ausserlechner MJ, Geley S, Kofler R. Glucocorticoid receptor heterozygosity combined with lack of receptor auto-induction causes glucocorticoid resistance in Jurkat acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S65–72.
144. Karl M, Von Wichert G, Kempter E, Katz DA, Reincke M, Mönig H, et al. Nelson's syndrome associated with a somatic frame shift mutation in the glucocorticoid receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:124–9.
145. Jiang T, Liu S, Tan M, Huang F, Sun Y, Dong X, et al. The phase-shift mutation in the glucocorticoid receptor gene: potential etiologic significance of neuroendocrine mechanisms in lupus nephritis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2001;313:113–7.

146. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:144–51.
147. van Rossum EFC, Lamberts SWJ. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004;59:333–57.
148. van Rossum EFC, Koper JW, Huizenga NATM, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes.* 2002;51:3128–34.
149. van Rossum EFC, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HCG, et al. The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:4004–9.
150. Russcher H, Smit P, van den Akker ELT, van Rossum EFC, Brinkmann AO, de Jong FH, et al. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:5804–10.
151. Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Rollins DY, Coffman D, Wiesch D. A TthIII1 polymorphism on the 5' flanking region of the glucocorticoid receptor gene (GRL). *Nucleic Acids Res.* 1991;19:1960.
152. van Rossum EFC, Roks PHM, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HAP, Koper JW, et al. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2004;61:573–81.
153. Luczay A, Török D, Ferenczi A, Majnik J, Sólyom J, Fekete G. Potential advantage of N363S glucocorticoid receptor polymorphism in 21-hydroxylase deficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 2006;154:859–64.
154. Boyle B, Korányi K, Patocs A, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 2008;92:131–4.
155. Bertalan R, Patócs A, Boyle B, Rigó J, Rácz K. The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 2009;25:379–82.
156. Szappanos A, Patócs A, Tőke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, et al. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2009;71:636–43.
157. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:1846–52.
158. van Rossum EFC, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2003;59:585–92.

159. Rosmond R. The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes. Res.* 2002;10:1078–86.
160. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, Périusse L, et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes. Res.* 1997;5:186–92.
161. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Després J-P, Drapeau V, Périusse L. Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:3141–5.
162. Di Blasio AM, van Rossum EFC, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podestà F, et al. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2003;59:68–74.
163. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG. An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J. Mol. Endocrinol.* 1992;9:295–300.
164. Ukkola O, Rosmond R, Tremblay A, Bouchard C. Glucocorticoid receptor Bcl I variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding. *Atherosclerosis*. 2001;157:221–4.
165. Ukkola O, Périusse L, Chagnon YC, Després JP, Bouchard C. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Québec Family Study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 2001;25:1332–9.
166. Fleury I, Primeau M, Doreau A, Costea I, Moghrabi A, Sinnett D, et al. Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Pharmacogenomics Genomics-Relat. Res. Drug Dev. Clin. Pract.* 2004;4:331–41.
167. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Périusse L, Lindell K, et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes. Res.* 2000;8:211–8.
168. Wüst S, Van Rossum EFC, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH. Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:565–73.
169. Bachmann AW, Sedgley TL, Jackson RV, Gibson JN, Young RM, Torpy DJ. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30:297–306.
170. van Winsen LLM, Hooper-van Veen T, van Rossum EFC, Polman CH, van den Berg TK, Koper JW, et al. The impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on glucocorticoid sensitivity is outweighed in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2005;167:150–6.
171. Zalewski G, Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Chyczewski L. Response to prednisone in relation to NR3C1 intron B polymorphisms in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 2008;23:1073–8.

172. Rousseau GG. Structure and regulation of the glucocorticoid hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1984;38:1–11.
173. Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. Structure and function of the glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem.* 1987;27:99–104.
174. Likó I, Igaz P, Patócs A, Tóth S, Pázmány T, Tóth M, et al. Sequence variants of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor gene and their functional consequences on the three-dimensional protein structure. *Curr. Med. Chem.* 2004;11:3229–37.
175. Rogatsky I, Wang J-C, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq CM, et al. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:13845–50.
176. Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids.* 2005;70:407–17.
177. Kumar R, Thompson EB. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005;94:383–94.
178. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006;102:11–21.
179. Encío IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1991;266:7182–8.
180. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132:1033–44.
181. Vandevyver S, Dejager L, Libert C. Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *Endocr. Rev.* 2014;35:671–93.
182. Yudit MR, Jewell CM, Bienstock RJ, Cidlowski JA. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:4319–30.
183. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.* 1995;95:2435–41.
184. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 1999;274:27857–66.
185. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, et al. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J. Exp. Med.* 2001;193:585–93.
186. Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA. Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27:2266–82.
187. Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;381:671–5.

188. Nagy Z, Acs B, Butz H, Feldman K, Marta A, Szabo PM, et al. Overexpression of GR β in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016;155:76–84.
189. Kino T, Su Y a, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 2009;66:3435–48.
190. Kelly A, Bowen H, Jee Y-K, Mahfiche N, Soh C, Lee T, et al. The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;121:203–8.e1.
191. Stechschulte LA, Wuescher L, Marino JS, Hill JW, Eng C, Hinds TD. Glucocorticoid receptor β stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of PTEN. *J. Biol. Chem.* 2014;289:17885–94.
192. Thomas-Chollier M, Watson LC, Cooper SB, Pufall M a, Liu JS, Borzym K, et al. A naturally occurring insertion of a single amino acid rewires transcriptional regulation by glucocorticoid receptor isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:17826–31.
193. Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, et al. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002;283:C1324–31.
194. Oakley RH, Webster JC, Sar M, Parker CR, Cidlowski JA. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology. Endocrine Society;* 1997;138:5028–38.
195. Hinds TD, Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, et al. Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2010;24:1715–27.
196. Goleva E, Li L-B, Eves PT, Strand MJ, Martin RJ, Leung DYM. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173:607–16.
197. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J. Exp. Med.* 1997;186:1567–74.
198. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsicopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;159:1600–4.
199. Kozaci DL, Chernajovsky Y, Chikanza IC. The differential expression of corticosteroid receptor isoforms in corticosteroid-resistant and -sensitive patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2007;46:579–85.
200. Towers R, Naftali T, Gabay G, Carlebach M, Klein A, Novis B. High levels of glucocorticoid receptors in patients with active Crohn's disease may predict steroid resistance. *Clin. Exp. Immunol.* 2005;141:357–62.

201. Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, et al. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2000;118:859–66.
202. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:6865–70.
203. Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA, et al. Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;254:559–65.
204. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Kanemitsu S, Hara T. Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr. Blood Cancer*. 2005;45:121–7.
205. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski J a. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1069:1–9.
206. Vandevyver S, Dejager L, Libert C. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.* 2014;35:671–93.
207. Rivers C, Levy A, Hancock J, Lightman S, Norman M. Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84:4283–6.
208. Taniguchi Y, Iwasaki Y, Tsugita M, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, et al. Glucocorticoid receptor-beta and receptor-gamma exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. *Endocrinology*. 2010;151:3204–13.
209. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2009;23:1572–83.
210. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 1997;18:306–60.
211. Freeman BC, Yamamoto KR. Continuous recycling: a mechanism for modulatory signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26:285–90.
212. Schiller BJ, Chodankar R, Watson LC, Stallcup MR, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor binds half sites as a monomer and regulates specific target genes. *Genome Biol. BioMed Central*; 2014;15:418.
213. Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*. 2011;145:224–41.

214. John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung M-H, Biddie SC, Johnson TA, et al. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011;43:264–8.
215. Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, et al. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.* 2009;19:2163–71.
216. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;380:41–54.
217. Reddy TE, Gertz J, Crawford GE, Garabedian MJ, Myers RM. The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32:3756–67.
218. Biddie SC, John S, Sabo PJ, Thurman RE, Johnson TA, Schiltz RL, et al. Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding. *Mol. Cell.* 2011;43:145–55.
219. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* 2003;24:488–522.
220. Engblom D, Kornfeld J-W, Schwake L, Tronche F, Reimann A, Beug H, et al. Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes Dev.* 2007;21:1157–62.
221. Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:9126–35.
222. Ishmael FT, Fang X, Houser KR, Pearce K, Abdelmohsen K, Zhan M, et al. The human glucocorticoid receptor as an RNA-binding protein: global analysis of glucocorticoid receptor-associated transcripts and identification of a target RNA motif. *J. Immunol. Baltim. Md 1950. American Association of Immunologists;* 2011;186:1189–98.
223. Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front. Neuroendocrinol.* 2008;29:273–91.
224. Borski RJ. Nongenomic Membrane Actions of Glucocorticoids in Vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000;11:427–36.
225. Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and . *Endocrinology.* 2003;144:1164–74.
226. Strehl C, Buttgereit F. Unraveling the functions of the membrane-bound glucocorticoid receptors: first clues on origin and functional activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014;1318:1–6.

227. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 2005;353:1711–23.
228. Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J. Endocrinol.* 2003;178:339–46.
229. De Bosscher K, Beck IM, Dejager L, Bougarne N, Gaigneaux A, Chateauvieux S, et al. Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF- κ B and AP-1. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 2014;71:143–63.
230. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet.* 2009;373:1905–17.
231. Fischer A, Gluth M, Weege F, Pape U-F, Wiedenmann B, Baumgart DC, et al. Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2014;306:G218–28.
232. Boivin MA, Ye D, Kennedy JC, Al-Sadi R, Shepela C, Ma TY. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007;292:G590–8.
233. De Iudicibus S, Franca R, Martelossi S, Ventura A, Decorti G. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2011;17:1095–108.
234. Maltese P, Palma L, Sfara C, de Rocco P, Latiano A, Palmieri O, et al. Glucocorticoid resistance in Crohn's disease and ulcerative colitis: an association study investigating GR and FKBP5 gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* 2012;12:432–8.
235. De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Londero M, Ebner E, Pontillo A, et al. Genetic predictors of glucocorticoid response in pediatric patients with inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Gastroenterol.* 2011;45:e1–7.
236. Zhang H, Ouyang Q, Wen Z-H, Fiocchi C, Liu W-P, Chen D-Y, et al. Significance of glucocorticoid receptor expression in colonic mucosal cells of patients with ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2005;11:1775–8.
237. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1971;68:2112–6.
238. Pittendrigh CS. TEMPORAL ORGANIZATION : Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 1993;55:17–54.
239. Tonsfeldt KJ, Chappell PE. Clocks on top: the role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;349:3–12.
240. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 2010;72:517–49.
241. Mohawk J a., Green CB, Takahashi JS. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 2012;35:445–62.
242. Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian

- oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. NATL ACAD SCIENCES*, 2101 CONSTITUTION AVE NW, WASHINGTON, DC 20418 USA; 2004;101:5339–46.
243. Bando H, Nishio T, van der Horst GTJ, Masubuchi S, Hisa Y, Okamura H. Vagal regulation of respiratory clocks in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2007;27:4359–65.
244. Cailotto C, Lei J, van der Vliet J, van Heijningen C, van Eden CG, Kalsbeek A, et al. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PloS One.* 2009;4:e5650.
245. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab. Elsevier Ltd*; 2010;21:277–86.
246. Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, et al. In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr. Biol. CB.* 2012;22:1029–34.
247. Richards J, Gumz ML. Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *FASEB J.* 2012;26:3602–13.
248. Welsh DK, Yoo S-H, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol. CB.* 2004;14:2289–95.
249. Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell.* 2004;119:693–705.
250. Aurélio Balsalobre FD, Schibler U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell.* 1998;93:929–37.
251. Balsalobre a, Brown S a, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 2000;289:2344–7.
252. Urlep Z, Rozman D. The Interplay between Circadian System, Cholesterol Synthesis, and Steroidogenesis Affects Various Aspects of Female Reproduction. *Front. Endocrinol. Frontiers Media SA*; 2013;4:111.
253. Kawamura M, Tasaki H, Misawa I, Chu G, Yamauchi N, Hattori M-A. Contribution of testosterone to the clock system in rat prostate mesenchyme cells. *Andrology.* 2014;2:225–33.
254. Pezük P, Mohawk JA, Wang LA, Menaker M. Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology. ENDOCRINE SOC, 8401 CONNECTICUT AVE, SUITE 900, CHEVY CHASE, MD 20815-5817 USA*; 2012;153:4775–83.
255. Reddy AB, Maywood ES, Karp N a, King VM, Inoue Y, Gonzalez FJ, et al. Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology. Baltim. Md.* 2007;45:1478–88.
256. Cuesta M, Cermakian N, Boivin DB. Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2015;29:1360–70.
257. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15 Spec No:R271–7.

258. Mehta N, Cheng H-YM. Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *J. Mol. Biol.* 2013;425:3609–24.
259. Lee C, Etchegaray J, Cagampang FRA, Loudon ASI, Reppert SM. Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell.* 2001;107:855–67.
260. Zsolt N, Károly R, Attila P. A perifériás cirkadián órák jelentősége az anyagcsere zavarok kialakulásában. *Magy. Belorvosi Arch.* 2014;67.
261. Ajabnoor GM, Bahijri S, Borai A, Abdulkhaliq AA, Al-Aama JY, Chrousos GP. Health impact of fasting in Saudi Arabia during Ramadan: association with disturbed circadian rhythm and metabolic and sleeping patterns. *PloS One.* 2014;9:e96500.
262. Maury E, Ramsey KM, Bass J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ. Res.* 2010;106:447–62.
263. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB. Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med.* 2011;8:e1001141.
264. Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2014;342:9–18.
265. Scheer FAJL, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:4453–8.
266. Möller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, et al. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:E1132–41.
267. Storch K-F, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature.* 2002;417:78–83.
268. Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, Tian J, et al. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* 2006;4:163–73.
269. Son GH, Chung S, Choe HK, Kim H-D, Baik S-M, Lee H, et al. Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:20970–5.
270. Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med. Nature Publishing Group;* 2010;16:67–74.
271. Duez H, van der Veen JN, Duhem C, Pourcet B, Touvier T, Fontaine C, et al. Regulation of Bile Acid Synthesis by the Nuclear Receptor Rev-erb α . *Gastroenterology.* 2008;135:689–98.
272. Zhou B, Zhang Y, Zhang F, Xia Y, Liu J, Huang R, et al. CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. *Hepatology. Baltim. Md.* 2014;59:2196–206.
273. Lee J, Moulik M, Fang Z, Saha P, Zou F, Xu Y, et al. Bmal1 and β -cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced β -cell failure in mice. *Mol. Cell. Biol.* 2013;33:2327–38.

274. Borgs L, Beukelaers P, Vandenbosch R, Belachew S, Nguyen L, Malgrange B. Cell circadian cycle: New role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle*. 2009. p. 832–7.
275. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*. 2002;111:41–50.
276. Gery S, Koeffler HP. Circadian rhythms and cancer. *Cell Cycle Georget. Tex.* 2010;9:1097–103.
277. Daly AF, Tichomirowa MA, Beckers A. The epidemiology and genetics of pituitary adenomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;23:543–54.
278. Dworakowska D, Grossman AB. The pathophysiology of pituitary adenomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;23:525–41.
279. Alexander JM, Biller BM, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J. Clin. Invest.* 1990;86:336–40.
280. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;71:1427–33.
281. Lania A, Mantovani G, Spada A. Genetics of pituitary tumors: Focus on G-protein mutations. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 2003;228:1004–17.
282. Yoshino A, Katayama Y, Ogino A, Watanabe T, Yachi K, Ohta T, et al. Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas. *J. Neurooncol.* 2007;83:153–62.
283. Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, Ota T, Komine C, et al. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005;64:398–403.
284. Korbonits M, Chahal HS, Kaltsas G, Jordan S, Urmanova Y, Khalimova Z, et al. Expression of phosphorylated p27(Kip1) protein and Jun activation domain-binding protein 1 in human pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:2635–43.
285. Butz H, Rácz K, Patócs A. Epigenetic and Posttranscriptional Alterations of Tumor Suppressor Genes in Sporadic Pituitary Adenomas. *Tumor Suppressor Genes* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2017 Jul 19]. Available from: <https://www.intechopen.com/download/pdf/27569>
286. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84:761–7.
287. Pei L, Melmed S, Scheithauer B, Kovacs K, Benedict WF, Prager D. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma susceptibility gene (RB) locus in aggressive pituitary tumors: evidence for a chromosome 13 tumor suppressor gene other than RB. *Cancer Res.* 1995;55:1613–6.
288. Wang Z, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity. *J. Biol. Chem.* 2000;275:7459–61.
289. Heaney AP, Melmed S. Pituitary tumour transforming gene: a novel factor in pituitary tumour formation. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;13:367–80.

290. Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 2004;23:2016–27.
291. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*. 1999;285:418–22.
292. Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene*. 2007;26:5596–605.
293. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr. Relat. Cancer*. 2007;14:887–900.
294. De Martino I, Visone R, Wierinckx A, Palmieri D, Ferraro A, Cappabianca P, et al. HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas. *Cancer Res*. 2009;69:1844–50.
295. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*. 2001;277:63–81.
296. Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trapasso F, et al. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene*. 1996;13:2439–46.
297. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2007;7:899–910.
298. Fedele M, Battista S, Kenyon L, Baldassarre G, Fidanza V, Klein-Szanto AJP, et al. Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. *Oncogene*. 2002;21:3190–8.
299. Pierantoni GM, Finelli P, Valtorta E, Giardino D, Rodeschini O, Esposito F, et al. High-mobility group A2 gene expression is frequently induced in non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), even in the absence of chromosome 12 polysomy. *Endocr. Relat. Cancer*. 2005;12:867–74.
300. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc*. 2009;22:431–41.
301. Butz H. MikroRNS-ek szerepe a hypophysis adenomák pathogenezisében. [Budapest]: Semmelweis Egyetem;
302. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2002;2:489–501.
303. Musat M, Korbonits M, Kola B, Borboli N, Hanson MR, Nanzer AM, et al. Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours. *Endocr. Relat. Cancer*. 2005;12:423–33.
304. Khattak MNK, Buchfelder M, Kleindienst A, Schöfl C, Kremenevskaja N. CRH and SRIF have opposite effects on the Wnt/ β -catenin signalling pathway through PKA/GSK-3 β in corticotroph pituitary cells. *Cancer Invest*. 2010;28:797–805.
305. Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Shaw JM, Law AJJ, et al. Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology*. 2008;149:1235–42.

306. Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, Sturgill TW. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett.* 1992;306:17–22.
307. Jordan S, Lidhar K, Korbonits M, Lowe DG, Grossman AB. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *Eur. J. Endocrinol.* 2000;143:R1–6.
308. Ewing I, Pedder-Smith S, Franchi G, Ruscica M, Emery M, Vax V, et al. A mutation and expression analysis of the oncogene BRAF in pituitary adenomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2007;66:348–52.
309. Zhan X, Desiderio DM. Signaling pathway networks mined from human pituitary adenoma proteomics data. *BMC Med. Genomics.* 2010;3:13.
310. Moreno CS, Evans C-O, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res.* 2005;65:10214–22.
311. Treier M, Gleiberman AS, O’Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, et al. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* 1998;12:1691–704.
312. Shorts-Cary L, Xu M, Ertel J, Kleinschmidt-Demasters BK, Lillehei K, Matsuoka I, et al. Bone morphogenetic protein and retinoic acid-inducible neural specific protein-3 is expressed in gonadotrope cell pituitary adenomas and induces proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology.* 2007;148:967–75.
313. Altenberger T, Bilban M, Auer M, Knosp E, Wolfsberger S, Gartner W, et al. Identification of DLK1 variants in pituitary- and neuroendocrine tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;340:995–1005.
314. Morris DG, Musat M, Czirják S, Hanzély Z, Lillington DM, Korbonits M, et al. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur. J. Endocrinol.* 2005;153:143–51.
315. Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, et al. Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:1729–36.
316. Hibberts NA, Simpson DJ, Bicknell JE, Broome JC, Hoban PR, Clayton RN, et al. Analysis of cyclin D1 (CCND1) allelic imbalance and overexpression in sporadic human pituitary tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 1999;5:2133–9.
317. Neto AG, McCutcheon IE, Vang R, Spencer ML, Zhang W, Fuller GN. Elevated expression of p21 (WAF1/Cip1) in hormonally active pituitary adenomas. *Ann. Diagn. Pathol.* 2005;9:6–10.
318. Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, Balestri A, Biondi A, Cazzaniga G, et al. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:3788–93.
319. Qi X, Chen Z, Liu D, Cen J, Gu M. Expression of Dlk1 gene in myelodysplastic syndrome determined by microarray, and its effects on leukemia cells. *Int. J. Mol. Med.* 2008;22:61–8.

320. Van Limpt VAE, Chan AJ, Van Sluis PG, Caron HN, Van Noesel CJM, Versteeg R. High delta-like 1 expression in a subset of neuroblastoma cell lines corresponds to a differentiated chromaffin cell type. *Int. J. Cancer*. 2003;105:61–9.
321. Grolmusz V. Sejtciklusdependens gén és mikroRNS expresszió vizsgálata és gyakorlati jelentősége mellékvesekéreg-karcinómában. [Budapest]: Semmelweis Egyetem; 2017.
322. Johnson A, Skotheim JM. Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25:717–23.
323. Nigg EA, Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol*. 2011;13:1154–60.
324. Hinchcliffe EH. Centrosomes and the art of mitotic spindle maintenance. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;313:179–217.
325. Godek KM, Kabeche L, Compton DA. Regulation of kinetochore-microtubule attachments through homeostatic control during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16:57–64.
326. Kotak S, Gonczy P. Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25:741–8.
327. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983;33:389–96.
328. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 1976;146:167–78.
329. Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*. 1987;327:31–5.
330. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989;246:629–34.
331. Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*. 1998;17:3365–83.
332. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:187–90.
333. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med*. 2006;6:739–48.
334. Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. Isolation of the human *cdk2* gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*. 1991;353:174–7.
335. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1992;89:2824–8.
336. Ito M. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol*. 2000;43:677–90.
337. Hershko A. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354:1571–5; discussion 1575–6.

338. Kozar K, Sicinski P. Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell Cycle*. 2005;4:388–91.
339. Gladden AB, Diehl JA. Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: breaking down the walls of dogma. *Cancer Cell*. 2003;4:160–2.
340. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 2008;14:159–69.
341. Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol*. 2001;51:219–29.
342. Morla AO, Draetta G, Beach D, Wang JY. Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*. 1989;58:193–203.
343. Krek W, Nigg EA. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J*. 1991;10:3331–41.
344. Parker LL, Atherton-Fessler S, Lee MS, Ogg S, Falk JL, Swenson KI, et al. Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *EMBO J*. 1991;10:1255–63.
345. Lee MS, Ogg S, Xu M, Parker LL, Donoghue DJ, Maller JL, et al. cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol Biol Cell*. 1992;3:73–84.
346. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995;9:1149–63.
347. Ravitz MJ, Wenner CE. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res*. 1997;71:165–207.
348. O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol*. 2000;10:296–303.
349. Lee JH, Paull TT. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*. 2007;26:7741–8.
350. Jia L, Kim S, Yu H. Tracking spindle checkpoint signals from kinetochores to APC/C. *Trends Biochem Sci*. 2013;38:302–11.
351. Muller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, et al. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2001;61:647–53.
352. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, et al. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol*. 2004;4:22.
353. Shih HC, Shiozawa T, Kato K, Imai T, Miyamoto T, Uchikawa J, et al. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum Pathol*. 2003;34:471–8.

354. Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2002;94:2874–81.
355. Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS. Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. *Histopathology*. 2009;55:28–36.
356. Sung WW, Lin YM, Wu PR, Yen HH, Lai HW, Su TC, et al. High nuclear/cytoplasmic ratio of Cdk1 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2014;14:951.
357. Gyorffy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8:e82241.
358. Xi Q, Huang M, Wang Y, Zhong J, Liu R, Xu G, et al. The expression of CDK1 is associated with proliferation and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2015;36:4939–48.
359. Kim SJ, Masuda N, Tsukamoto F, Inaji H, Akiyama F, Sonoo H, et al. The cell cycle profiling-risk score based on CDK1 and 2 predicts early recurrence in node-negative, hormone receptor-positive breast cancer treated with endocrine therapy. *Cancer Lett*. 2014;355:217–23.
360. Rosenblatt R, Jonmarker S, Lewensohn R, Egevad L, Sherif A, Kalkner KM, et al. Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer. *Tumour Biol*. 2008;29:311–22.
361. Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 2005;46:597–613.
362. Fiorentino M, Altimari A, D’Errico A, Cukor B, Barozzi C, Loda M, et al. Acquired expression of p27 is a favorable prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6:3966–72.
363. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro A, Fassina A, Vieceli G, et al. Absence of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 1999;6:19–25.
364. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*. 1997;3:227–30.
365. Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, Yazawa T, Inayama Y, Ito T, et al. High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*. 2001;34:59–65.
366. Cho RJ, Huang M, Campbell MJ, Dong H, Steinmetz L, Sapinoso L, et al. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet*. 2001;27:48–54.
367. Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell*. 2002;13:1977–2000.

368. Bar-Joseph Z, Siegfried Z, Brandeis M, Brors B, Lu Y, Eils R, et al. Genome-wide transcriptional analysis of the human cell cycle identifies genes differentially regulated in normal and cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2008;105:955–60.
369. Yoshizawa-Sugata N, Masai H. Cell cycle synchronization and flow cytometry analysis of mammalian cells. *Methods Mol Biol*. 2014;1170:279–93.
370. Stumpf CR, Moreno MV, Olshen AB, Taylor BS, Ruggero D. The translational landscape of the mammalian cell cycle. *Mol Cell*. 2013;52:574–82.
371. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*. 1999;283:83–7.
372. Tobey RA, Valdez JG, Crissman HA. Synchronization of human diploid fibroblasts at multiple stages of the cell cycle. *Exp Cell Res*. 1988;179:400–16.
373. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Growth imbalance and altered expression of cyclins B1, A, E, and D3 in MOLT-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication. *Cell Growth Differ*. 1995;6:1485–93.
374. Urbani L, Sherwood SW, Schimke RT. Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp Cell Res*. 1995;219:159–68.
375. Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, et al. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytom. A*. 2007;71:648–61.
376. Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H, Podhorecka M. Cell synchronization by inhibitors of DNA replication induces replication stress and DNA damage response: analysis by flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2011;761:85–96.
377. Kishore S, Gruber AR, Jedlinski DJ, Syed AP, Jorjani H, Zavolan M. Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing. *Genome Biol*. 2013;14:R45.
378. Leman AR, Bristow SL, Haase SB. Analyzing transcription dynamics during the budding yeast cell cycle. *Methods Mol Biol*. 2014;1170:295–312.
379. Walker GM. Synchronization of yeast cell populations. *Methods Cell Sci*. 1999;21:87–93.
380. Orlando DA, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JE, Iversen ES, et al. Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature*. 2008;453:944–7.
381. Simmons Kovacs LA, Mayhew MB, Orlando DA, Jin Y, Li Q, Huang C, et al. Cyclin-dependent kinases are regulators and effectors of oscillations driven by a transcription factor network. *Mol Cell*. 2012;45:669–79.
382. Moore A, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol*. 1998;57:265–78.
383. Henderson L, Bortone DS, Lim C, Zambon AC. Classic “broken cell” techniques and newer live cell methods for cell cycle assessment. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304:C927–38.

384. Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC. DNA labeling in living cells. *Cytom. A*. 2005;67:45–52.
385. Juan G, Hernando E, Cordon-Cardo C. Separation of live cells in different phases of the cell cycle for gene expression analysis. *Cytometry*. 2002;49:170–5.
386. Van der Aa N, Cheng J, Mateiu L, Zamani Esteki M, Kumar P, Dimitriadou E, et al. Genome-wide copy number profiling of single cells in S-phase reveals DNA-replication domains. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:e66.
387. Bristow SL, Leman AR, Haase SB. Cell cycle-regulated transcription: effectively using a genomics toolbox. *Methods Mol Biol*. 2014;1170:3–27.
388. Hereford LM, Osley MA, Ludwig TR 2nd, McLaughlin CS. Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell*. 1981;24:367–75.
389. Cho RJ, Campbell MJ, Winzler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, et al. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell*. 1998;2:65–73.
390. Pramila T, Wu W, Miles S, Noble WS, Breeden LL. The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes Dev*. 2006;20:2266–78.
391. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*. 1998;9:3273–97.
392. Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lio P, Penkett CJ, Burns G, et al. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet*. 2004;36:809–17.
393. Peng X, Karuturi RK, Miller LD, Lin K, Jia Y, Kondu P, et al. Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2005;16:1026–42.
394. Oliva A, Rosebrock A, Ferrezuelo F, Pyne S, Chen H, Skiena S, et al. The cell cycle-regulated genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol*. 2005;3:e225.
395. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:518–28.
396. Bahler J. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet*. 2005;39:69–94.
397. Fukuoka M, Uehara A, Niki K, Goto S, Kato D, Utsugi T, et al. Identification of preferentially reactivated genes during early G1 phase using nascent mRNA as an index of transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430:1005–10.
398. Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126:682–92.
399. Rodriguez Fernandez JL, Geiger B, Salomon D, Sabanay I, Zoller M, Ben-Ze'ev A. Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol*. 1992;119:427–38.

400. Rudiger M. Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *Bioessays*. 1998;20:733–40.
401. Shedden K, Cooper S. Analysis of cell-cycle-specific gene expression in human cells as determined by microarrays and double-thymidine block synchronization. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2002;99:4379–84.
402. Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat. Genet*. 2006;38:1452–6.
403. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15–20.
404. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
405. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2006;91:3584–91.
406. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:858–62.
407. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:862–4.
408. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–97.
409. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455:58–63.
410. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107:823–6.
411. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350–5.
412. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 2003;301:336–8.
413. Carrington JC. Small RNAs and Arabidopsis. A fast forward look. *Plant Physiol*. 2005;138:565–6.
414. Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*. 2005;65:3509–12.
415. Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J. Cell. Physiol*. 2007;210:370–7.
416. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2002;99:15524–9.
417. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2004;101:2999–3004.

418. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005;65:6029–33.
419. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65:7065–70.
420. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res. MCR.* 2003;1:882–91.
421. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64:3753–6.
422. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103:2257–61.
423. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res.* 2007;67:976–83.
424. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:1290–7.
425. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Neder L, Machado HR, Silva WA, et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94:320–3.
426. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302:1–12.
427. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:369–78.
428. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:592–601.
429. Bueno MJ, Gomez de Cedron M, Laresgoiti U, Fernandez-Piqueras J, Zubiaga AM, Malumbres M. Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. *Mol Cell Biol.* 2010;30:2983–95.
430. Ofir M, Hacohen D, Ginsberg D. MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Mol Cancer Res.* 2011;9:440–7.
431. Rissland OS, Hong SJ, Bartel DP. MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. *Mol Cell.* 2011;43:993–1004.
432. Zhou JY, Ma WL, Liang S, Zeng Y, Shi R, Yu HL, et al. Analysis of microRNA expression profiles during the cell cycle in synchronized HeLa cells. *BMB Rep.* 2009;42:593–8.
433. Vecsei P, Onyechi R, Hornung J, Dietz R, Mast G, Hobler H. Use of corticosteroid antibodies for the study of corticosteroid biosynthesis in vitro. *J. Steroid Biochem.* 1975;6:383–7.

434. Vecsei P. Glucocorticoids: cortisol, cortisone, corticosterone, compound S and their metabolites. *Methods Horm. Radioimmunoassay*. Bernard Jaffe. New York: Academic Press; 1979. p. 767–96.
435. Patocs A, Klein I, Szilvasi A, Gergics P, Toth M, Valkusz Z, et al. Genotype-phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2006;118:417–21.
436. Gergics P, Toke J, Szilágyi A, Szappanos A, Kender Z, Barta G, et al. [Methods for the analysis of large gene deletions and their application in some hereditary diseases]. *Orv. Hetil.* 2009;150:2258–64.
437. Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, Prowse A, Latif F, et al. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 1994;3:1303–8.
438. Hes FJ, Höppener JWM, Lips CJM. Clinical review 155: Pheochromocytoma in Von Hippel-Lindau disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:969–74.
439. Cybulski C, Krzystolik K, Murgia A, Górski B, Debniak T, Jakubowska A, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire VHL gene. *J. Med. Genet.* 2002;39:E38.
440. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jürgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, et al. Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood.* 2002;99:3562–5.
441. Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, Sergueeva AI, Polyakova LA, Miasnikova GY, et al. Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2002;28:57–62.
442. Pastore YD, Jelinek J, Ang S, Guan Y, Liu E, Jedlickova K, et al. Mutations in the VHL gene in sporadic apparently congenital polycythemia. *Blood.* 2003;101:1591–5.
443. Pastore Y, Jedlickova K, Guan Y, Liu E, Fahner J, Hasle H, et al. Mutations of von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and congenital polycythemia. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;73:412–9.
444. Cario H, Schwarz K, Jorch N, Kyank U, Petrides PE, Schneider DT, et al. Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and VHL-haplotype analysis in patients with presumable congenital erythrocytosis. *Haematologica.* 2005;90:19–24.
445. Bento MC, Chang KT, Guan Y, Liu E, Caldas G, Gatti RA, et al. Congenital polycythemia with homozygous and heterozygous mutations of von Hippel-Lindau gene: five new Caucasian patients. *Haematologica.* 2005;90:128–9.
446. Randi ML, Murgia A, Putti MC, Martella M, Casarin A, Opocher G, et al. Low frequency of VHL gene mutations in young individuals with polycythemia and high serum erythropoietin. *Haematologica.* 2005;90:689–91.
447. Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004;10:6290S – 5S.
448. Perrotta S, Nobili B, Ferraro M, Migliaccio C, Borriello A, Cucciolla V, et al. Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood.* 2006;107:514–9.

449. Crawford ED, Henning DC, Wendel RG. Renal cell carcinoma in a horseshoe kidney associated with von Hippel-Lindau disease. *J. Urol.* 1979;121:677–8.
450. Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5:639–44.
451. Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Pheochromocytoma. *Lancet Lond. Engl.* 2005;366:665–75.
452. Korpershoek E, Van Nederveen FH, Dannenberg H, Petri BJ, Komminoth P, Perren A, et al. Genetic analyses of apparently sporadic pheochromocytomas: the Rotterdam experience. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1073:138–48.
453. Neumann HP, Berger DP, Sigmund G, Blum U, Schmidt D, Parmer RJ, et al. Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:1531–8.
454. Bar M, Friedman E, Jakobovitz O, Leibowitz G, Lerer I, Abeliovich D, et al. Sporadic pheochromocytomas are rarely associated with germline mutations in the von Hippel-Lindau and RET genes. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 1997;47:707–12.
455. Hergovich A, Lisztwan J, Thoma CR, Wirbelauer C, Barry RE, Krek W. Priming-dependent phosphorylation and regulation of the tumor suppressor pVHL by glycogen synthase kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:5784–96.
456. Lolkema MP, Gervais ML, Snijckers CM, Hill RP, Giles RH, Voest EE, et al. Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J. Biol. Chem.* 2005;280:22205–11.
457. Miller F, Kentsis A, Osman R, Pan Z-Q. Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL.hypoxia-inducible transcription factor-1alpha complex. *J. Biol. Chem.* 2005;280:7985–96.
458. Patocs A, Gergics P, Balogh K, Toth M, Fazakas F, Liko I, et al. Ser80Ile mutation and a concurrent Pro25Leu variant of the VHL gene in an extended Hungarian von Hippel-Lindau family. *BMC Med. Genet.* 2008;9:29.
459. Lendvai N, Szabó I, Butz H, Beko G, Horányi J, Tarjányi M, et al. [Extra-adrenal pheochromocytoma associated to SDHD gene mutation]. *Orv. Hetil.* 2009;150:645–9.
460. Patócs A, Lendvai NK, Butz H, Liko I, Sapi Z, Szucs N, et al. Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. *Pathol. Oncol. Res. POR.* 2016;22:673–9.
461. Bausch B, Schiavi F, Ni Y, Welander J, Patocs A, Ngeow J, et al. Clinical Characterization of the Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for Gene-Informed Prevention. *JAMA Oncol.* 2017;
462. Lima J, Teixeira-Gomes J, Soares P, Máximo V, Honavar M, Williams D, et al. Germline succinate dehydrogenase subunit D mutation segregating with familial non-RET C cell hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:4932–7.

463. Montani M, Schmitt AM, Schmid S, Locher T, Saremaslani P, Heitz PU, et al. No mutations but an increased frequency of SDHx polymorphisms in patients with sporadic and familial medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer*. 2005;12:1011–6.
464. Cascon A, Cebrian A, Pollan M, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Leton R, et al. Succinate dehydrogenase D variants do not constitute a risk factor for developing C cell hyperplasia or sporadic medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005;90:2127–30.
465. Lendvai N, Tóth M, Valkusz Z, Bekő G, Szücs N, Csajbók E, et al. Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome. *Clin. Sao Paulo Braz*. 2012;67 Suppl 1:85–9.
466. Zbuk KM, Patocs A, Shealy A, Sylvester H, Miesfeldt S, Eng C. Germline mutations in PTEN and SDHC in a woman with epithelial thyroid cancer and carotid paraganglioma. *Nat. Clin. Pract. Oncol*. 2007;4:608–12.
467. Kytölä S, Nord B, Elder EE, Carling T, Kjellman M, Cedermark B, et al. Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids, Merkel cell carcinomas, pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2002;34:325–32.
468. Perren A, Barghorn A, Schmid S, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU, et al. Absence of somatic SDHD mutations in sporadic neuroendocrine tumors and detection of two germline variants in paraganglioma patients. *Oncogene*. 2002;21:7605–8.
469. Cascón A, Ruiz-Llorente S, Cebrián A, Letón R, Tellería D, Benítez J, et al. G12S and H50R variations are polymorphisms in the SDHD gene. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2003;37:220–1.
470. Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, Hino O, Hartman PS, Ishii N. A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005;65:203–9.
471. Slane BG, Aykin-Burns N, Smith BJ, Kalen AL, Goswami PC, Domann FE, et al. Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O₂·, oxidative stress, and genomic instability. *Cancer Res*. 2006;66:7615–20.
472. Weng L-P, Brown JL, Baker KM, Ostrowski MC, Eng C. PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum. Mol. Genet*. 2002;11:1687–96.
473. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95:29–39.
474. Seo JH, Ahn Y, Lee S-R, Yeol Yeo C, Chung Hur K. The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. *Mol. Biol. Cell*. 2005;16:348–57.
475. Salmeen A, Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid. Redox Signal*. 2005;7:560–77.

476. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T, Patocs A, Lobo G, Edelman E, et al. Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;83:261–8.
477. Ishii N, Ishii T, Hartman PS. The role of the electron transport SDHC gene on lifespan and cancer. *Mitochondrion.* 2007;7:24–8.
478. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J. Biol. Chem.* 2002;277:42563–71.
479. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P, Eisenhofer G, Patocs A, Veech RL, et al. Succinate-to-fumarate ratio as a new metabolic marker to detect the presence of SDHB/D-related paraganglioma: initial experimental and ex vivo findings. *Endocrinology.* 2014;155:27–32.
480. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 2005;7:77–85.
481. Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14:2231–9.
482. Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28:718–31.
483. Balogh K, Hunyady L, Patocs A, Gergics P, Valkusz Z, Toth M, et al. MEN1 gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol Oxf.* 2007;67:727–34.
484. Balogh K, Patocs A, Majnik J, Varga F, Illyes G, Hunyady L, et al. Unusual presentation of multiple endocrine neoplasia type 1 in a young woman with a novel mutation of the MEN1 gene. *J Hum Genet.* 2004;49:380–6.
485. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:2617–20.
486. Ellard S, Hattersley AT, Brewer CM, Vaidya B. Detection of an MEN1 gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing. *Clin Endocrinol Oxf.* 2005;62:169–75.
487. Ohye H, Sato M, Matsubara S, Miyauchi A, Kishi-Imai K, Murao K, et al. A novel germline mutation of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene in a Japanese MEN1 patient and her daughter. *Endocr. J.* 1999;46:325–9.
488. Bassett JH, Forbes SA, Pannett AA, Lloyd SE, Christie PT, Wooding C, et al. Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;62:232–44.
489. Occhi G, Regazzo D, Trivellin G, Boaretto F, Ciato D, Bobisse S, et al. A novel mutation in the upstream open reading frame of the CDKN1B gene causes a MEN4 phenotype. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003350.

490. Piotrowska K, Pellegata NS, Rosemann M, Fritz A, Graw J, Atkinson MJ. Mapping of a novel MEN-like syndrome locus to rat chromosome 4. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 2004;15:135–41.
491. Milos IN, Frank-Raue K, Wohllk N, Maia AL, Pusiol E, Patocs A, et al. Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation. *Endocr. Relat. Cancer.* 2008;15:1035–41.
492. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, et al. Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum. Mutat.* 2011;32:51–8.
493. Bausch B, Wellner U, Bausch D, Schiavi F, Barontini M, Sanso G, et al. Long-term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma. *Endocr. Relat. Cancer.* 2014;21:17–25.
494. Castinetti F, Qi X-P, Walz MK, Maia AL, Sansó G, Peczkowska M, et al. Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study. *Lancet Oncol.* 2014;15:648–55.
495. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, et al. Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006;100:161–6.
496. Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, et al. Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91:2796–9.
497. Bodwell JE, Webster JC, Jewell CM, Cidlowski JA, Hu JM, Munck A. Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998;65:91–9.
498. Dobson MG, Redfern CP, Unwin N, Weaver JU. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:2270–4.
499. Lin RCY, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ. Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obes. Res.* 2003;11:802–8.
500. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2003;59:237–41.
501. Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, et al. Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:5808–13.
502. Andrews RC, Herlihy O, Livingstone DEW, Andrew R, Walker BR. Abnormal cortisol metabolism and tissue sensitivity to cortisol in patients with glucose intolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:5587–93.
503. Bánlaki Z, Raizer G, Acs B, Majnik J, Doleschall M, Szilágyi A, et al. ACTH-induced cortisol release is related to the copy number of the C4B gene encoding the fourth component of

- complement in patients with non-functional adrenal incidentaloma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2012;76:478–84.
504. Homo-Delarche F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nunez EA, Bach JF, Dardenne M. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1991;40:619–37.
505. Chandola T, Britton A, Brunner E, Hemingway H, Malik M, Kumari M, et al. Work stress and coronary heart disease: what are the mechanisms? *Eur. Heart J.* 2008;29:640–8.
506. Kramer J, Fülöp T, Rajczy K, Nguyen AT, Füst G. A marked drop in the incidence of the null allele of the B gene of the fourth component of complement (C4B*Q0) in elderly subjects: C4B*Q0 as a probable negative selection factor for survival. *Hum. Genet.* 1991;86:595–8.
507. Arason GJ, Bödvarsson S, Sigurdarson ST, Sigurdsson G, Thorgeirsson G, Gudmundsson S, et al. An age-associated decrease in the frequency of C4B*Q0 indicates that null alleles of complement may affect health or survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;1010:496–9.
508. Arason GJ, Kramer J, Blaskó B, Kolka R, Thorbjornsdottir P, Einarisdóttir K, et al. Smoking and a complement gene polymorphism interact in promoting cardiovascular disease morbidity and mortality. *Clin. Exp. Immunol.* 2007;149:132–8.
509. Kubzansky LD, Adler GK. Aldosterone: a forgotten mediator of the relationship between psychological stress and heart disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010;34:80–6.
510. Szabó JA, Szilágyi Á, Doleschall Z, Patócs A, Farkas H, Prohászka Z, et al. Both positive and negative selection pressures contribute to the polymorphism pattern of the duplicated human CYP21A2 gene. *PloS One.* 2013;8:e81977.
511. Doleschall M, Szabó JA, Pázmándi J, Szilágyi Á, Koncz K, Farkas H, et al. Common genetic variants of the human steroid 21-hydroxylase gene (CYP21A2) are related to differences in circulating hormone levels. *PloS One.* 2014;9:e107244.
512. Szabo PM, Butz H, Igaz P, Racz K, Hunyady L, Patocs A. Minireview: miRomics in endocrinology: a novel approach for modeling endocrine diseases. *Mol Endocrinol.* 2013;27:573–85.
513. Hagendorf A, Koper JW, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SWJ, Feelders RA. Expression of the human glucocorticoid receptor splice variants alpha, beta, and P in peripheral blood mononuclear leukocytes in healthy controls and in patients with hyper- and hypocortisolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:6237–43.
514. Breslin MB, Geng CD, Vedeckis WV. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2001;15:1381–95.
515. Arzt E, Kovalovsky D, Igaz LM, Costas M, Plazas P, Refojo D, et al. Functional cross-talk among cytokines, T-cell receptor, and glucocorticoid receptor transcriptional activity and action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;917:672–7.
516. Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP, Bornstein SR. Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1998;339:27–31.

517. Tacon LJ, Soon PS, Gill AJ, Chou AS, Clarkson A, Botling J, et al. The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94:4591–9.
518. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, et al. Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2016;6:2041–53.
519. Boyle B, Butz H, Liko I, Zalatnai A, Toth M, Feldman K, et al. Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids.* 2010;75:695–700.
520. Lefebvre H, Prévost G, Louiset E. Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 2013;169:R115–38.
521. Asser L, Hescot S, Viengchareun S, Delemer B, Trabado S, Lombès M. Autocrine positive regulatory feedback of glucocorticoid secretion: Glucocorticoid receptor directly impacts H295R human adrenocortical cell function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014;395:1–9.
522. Herman JP, Watson SJ, Chao HM, Coirini H, McEwen BS. Diurnal Regulation of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor mRNAs in Rat Hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 1993;4:181–90.
523. Xu RB, Liu ZM, Zhao Y. A study on the circadian rhythm of glucocorticoid receptor. *Neuroendocrinology.* 1991;53 Suppl 1:31–6.
524. Yao Z, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ. Modeling circadian rhythms of glucocorticoid receptor and glutamine synthetase expression in rat skeletal muscle. *Pharm. Res. NIH Public Access;* 2006;23:670–9.
525. Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 2001;276:42714–21.
526. Cao Q, Gery S, Dashti A, Yin D, Zhou Y, Gu J, et al. A role for the clock gene *per1* in prostate cancer. *Cancer Res.* 2009;69:7619–25.
527. Nakamura TJ, Sellix MT, Kudo T, Nakao N, Yoshimura T, Ebihara S, et al. Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids.* 2010;75:203–12.
528. Feillet C, van der Horst GTJ, Levi F, Rand DA, Delaunay F. Coupling between the Circadian Clock and Cell Cycle Oscillators: Implication for Healthy Cells and Malignant Growth. *Front. Neurol.* 2015;6:96.
529. Yang J, Kim KD, Lucas A, Drahos KE, Santos CS, Mury SP, et al. A Novel Heme-Regulatory Motif Mediates Heme-Dependent Degradation of the Circadian Factor Period 2 $\square$. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28:4697–711.
530. Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Amanda K, McClure DB, et al. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:1207–13.

531. Yamajuku D, Inagaki T, Haruma T, Okubo S, Kataoka Y, Kobayashi S, et al. Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*; 2012;2:935–41.
532. Torra SP, Tsibulsky V, Delaunay F, Kosykh V, Staels B, Invern U. Circadian and Glucocorticoid Regulation of Rev-erb α Expression in Liver. *Endocrinology*. 2000;141:3799–806.
533. Yoder JM, Brandeland M, Engeland WC. Phase-dependent resetting of the adrenal clock by ACTH in vitro. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014;306:R387–93.
534. Fahrenkrug J, Hannibal J, Georg B. Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20:323–9.
535. Castro M De, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, et al. The non-ligand binding β -Isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR β): tissue Levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol. Med.* 1996;2:597–607.
536. Heilmann K, Hoffmann U, Witte E, Loddenkemper C, Sina C, Schreiber S, et al. Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13:1162–74.
537. Mor-Vaknin N, Legendre M, Yu Y, Serezani CHC, Garg SK, Jatzek A, et al. Murine colitis is mediated by vimentin. *Sci. Rep.* 2013;3:1045.
538. Ng Y-L, Klopčič B, Lloyd F, Forrest C, Greene W, Lawrance IC. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) exacerbates colonic inflammatory symptoms in dextran sodium sulphate-induced murine colitis. *PloS One*. 2013;8:e77575.
539. Wu F, Chakravarti S. Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2007;179:6988–7000.
540. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, et al. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2011;14:112–24.
541. Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell*. 2009;137:87–98.
542. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92:5545–9.
543. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994;371:257–61.
544. Lebrun J-J. Activin, TGF-beta and menin in pituitary tumorigenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009;668:69–78.
545. Danila DC, Zhang X, Zhou Y, Haidar JNS, Klibanski A. Overexpression of wild-type activin receptor alk4-1 restores activin antiproliferative effects in human pituitary tumor cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:4741–6.

546. Kulig E, Jin L, Qian X, Horvath E, Kovacs K, Stefaneanu L, et al. Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitaries: expression of the Bcl-2 family of proteins. *Am. J. Pathol.* 1999;154:767–74.
547. ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2000;25:64–70.
548. Evans CO, Young AN, Brown MR, Brat DJ, Parks JS, Neish AS, et al. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:3097–107.
549. D'Abronzio FH, Swearingen B, Klibanski A, Alexander JM. Mutational analysis of activin/transforming growth factor-beta type I and type II receptor kinases in human pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84:1716–21.
550. Wang Y, Fortin J, Lamba P, Bonomi M, Persani L, Roberson MS, et al. Activator protein-1 and smad proteins synergistically regulate human follicle-stimulating hormone beta-promoter activity. *Endocrinology.* 2008;149:5577–91.
551. Prezant TR, Levine J, Melmed S. Molecular characterization of the men1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:1388–91.
552. Wenbin C, Asai A, Teramoto A, Sanno N, Kirino T. Mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. *Cancer Lett.* 1999;142:43–7.
553. Shattuck TM, Costa J, Bernstein M, Jensen RT, Chung DC, Arnold A. Mutational analysis of Smad3, a candidate tumor suppressor implicated in TGF-beta and menin pathways, in parathyroid adenomas and enteropancreatic endocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:3911–4.
554. Mishra L, Shetty K, Tang Y, Stuart A, Byers SW. The role of TGF-beta and Wnt signaling in gastrointestinal stem cells and cancer. *Oncogene.* 2005;24:5775–89.
555. Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 2008;68:8191–4.
556. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, et al. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95:E181–91.
557. McGowan CH, Russell P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* 1993;12:75–85.
558. Hirai H, Arai T, Okada M, Nishibata T, Kobayashi M, Sakai N, et al. MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil. *Cancer Biol. Ther.* 2010;9:514–22.
559. Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* 2004;3:513–9.
560. Butz H, Németh K, Czenke D, Likó I, Czirják S, Zivkovic V, et al. Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Pathol. Oncol. Res. POR.* 2016;

561. Grolmusz VK, Toth EA, Baghy K, Liko I, Darvasi O, Kovalszky I, et al. Fluorescence activated cell sorting followed by small RNA sequencing reveals stable microRNA expression during cell cycle progression. *BMC Genomics*. 2016;17:412.
562. Mizuno H, Nakanishi Y, Ishii N, Sarai A, Kitada K. A signature-based method for indexing cell cycle phase distribution from microarray profiles. *BMC Genomics*. 2009;10:137.
563. Liu JJ, Chao JR, Jiang MC, Ng SY, Yen JJ, Yang-Yen HF. Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3654–63.
564. Wimmel A, Lucibello FC, Sewing A, Adolph S, Muller R. Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene*. 1994;9:995–7.
565. Karn J, Watson JV, Lowe AD, Green SM, Vedeckis W. Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. *Oncogene*. 1989;4:773–87.
566. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1999;96:6199–204.
567. Vecchione A, Croce CM, Baldassarre G. Fez1/Lzts1 a new mitotic regulator implicated in cancer development. *Cell Div*. 2007;2:24.
568. Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, et al. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J Biol Chem*. 2007;282:19259–71.
569. Leung JY, Ehmann GL, Giangrande PH, Nevins JR. A role for Myc in facilitating transcription activation by E2F1. *Oncogene*. 2008;27:4172–9.
570. Dong P, Maddali MV, Srimani JK, Thelot F, Nevins JR, Mathey-Prevot B, et al. Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. *Nat Commun*. 2014;5:4750.
571. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*. 2010;18:181–7.
572. Diaz R, Silva J, Garcia JM, Lorenzo Y, Garcia V, Pena C, et al. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2008;47:794–802.
573. Guo X, Guo L, Ji J, Zhang J, Zhang J, Chen X, et al. miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398:1–6.
574. Hausser J, Syed AP, Selevsek N, van Nimwegen E, Jaskiewicz L, Aebersold R, et al. Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation. *Mol Syst Biol*. 2013;9:711.
575. Eriksson S, Graslund A, Skog S, Thelander L, Tribukait B. Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by de novo protein synthesis. *J Biol Chem*. 1984;259:11695–700.
576. Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:119–23.

577. Herrick J, Sclavi B. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol.* 2007;63:22–34.
578. Standart NM, Bray SJ, George EL, Hunt T, Ruderman JV. The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. *J Cell Biol.* 1985;100:1968–76.
579. Engstrom Y, Eriksson S, Jildevik I, Skog S, Thelander L, Tribukait B. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem.* 1985;260:9114–6.
580. Fang Z, Gong C, Liu H, Zhang X, Mei L, Song M, et al. E2F1 promote the aggressiveness of human colorectal cancer by activating the ribonucleotide reductase small subunit M2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464:407–15.
581. Liu X, Zhang H, Lai L, Wang X, Loera S, Xue L, et al. Ribonucleotide reductase small subunit M2 serves as a prognostic biomarker and predicts poor survival of colorectal cancers. *Clin. Sci.* 2013;124:567–78.
582. Zhang H, Liu X, Warden CD, Huang Y, Loera S, Xue L, et al. Prognostic and therapeutic significance of ribonucleotide reductase small subunit M2 in estrogen-negative breast cancers. *BMC Cancer.* 2014;14:664.
583. Putluri N, Maity S, Kommagani R, Creighton CJ, Putluri V, Chen F, et al. Pathway-centric integrative analysis identifies RRM2 as a prognostic marker in breast cancer associated with poor survival and tamoxifen resistance. *Neoplasia.* 2014;16:390–402.
584. Mah V, Alavi M, Marquez-Garban DC, Maresh EL, Kim SR, Horvath S, et al. Ribonucleotide reductase subunit M2 predicts survival in subgroups of patients with non-small cell lung carcinoma: effects of gender and smoking status. *PLoS One.* 2015;10:e0127600.
585. Lee B, Ha SY, Song DH, Lee HW, Cho SY, Park CK. High expression of ribonucleotide reductase subunit M2 correlates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut Liver.* 2014;8:662–8.
586. Germano A, Rapa I, Volante M, Lo Buono N, Carturan S, Berruti A, et al. Cytotoxic activity of gemcitabine, alone or in combination with mitotane, in adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382:1–7.
587. Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, et al. Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:917–32.
588. Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, et al. Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17:445–53.
589. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, et al. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2057–62.
590. Zsippai A, Szabo DR, Tombol Z, Szabo PM, Eder K, Pallinger E, et al. Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study. *Pharmacogenomics.* 2012;13:1351–61.

591. Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, et al. Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15:623–34.
592. Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Misiti S, Raza G, et al. Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. *Int J Oncol*. 2010;37:493–501.
593. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene*. 2004;23:1539–48.
594. Bhutia YD, Hung SW, Krentz M, Patel D, Lovin D, Manoharan R, et al. Differential processing of let-7a precursors influences RRM2 expression and chemosensitivity in pancreatic cancer: role of LIN-28 and SET oncoprotein. *PLoS One*. 2013;8:e53436.
595. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*. 2011;117:1630–9.
596. Patel D, Boufraqueh M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, et al. MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery*. 2013;154:1224–8; discussion 1229.
597. Chabre O, Libé R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, et al. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer*. 2013;20:579–94.
598. Hu Z, Shen W-J, Cortez Y, Tang X, Liu L-F, Kraemer FB, et al. Hormonal regulation of microRNA expression in steroid producing cells of the ovary, testis and adrenal gland. *PloS One*. 2013;8:e78040.
599. Murri M, Insenser M, Fernández-Durán E, San-Millán JL, Escobar-Morreale HF. Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2013;98:E1835–44.
600. Chen W-J, Yin K, Zhao G-J, Fu Y-C, Tang C-K. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;222:314–23.
601. Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Da Costa Martins P, et al. Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2014;63:920–7.
602. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, et al. A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PloS One*. 2013;8:e70644.
603. Heegaard NHH, Schetter AJ, Welsh JA, Yoneda M, Bowman ED, Harris CC. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2012;130:1378–86.
604. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23:4051–60.

605. McFarlane C, Vajjala A, Arigela H, Lokireddy S, Ge X, Bonala S, et al. Negative auto-regulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and microRNA-27. *PloS One*. 2014;9:e87687.
606. Song CZ, Tian X, Gelehrter TD. Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor-beta signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96:11776–81.
607. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SLT, Wong MTK, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97:E2271–6.
608. Geer EB, Islam J, Buettner C. Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2014;43:75–102.
609. Newey PJ, Nesbit MA, Rimmer AJ, Attar M, Head RT, Christie PT, et al. Whole-exome sequencing studies of nonhereditary (sporadic) parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E1995–2005.
610. Cromer MK, Starker LF, Choi M, Udelsman R, Nelson-Williams C, Lifton RP, et al. Identification of somatic mutations in parathyroid tumors using whole-exome sequencing. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E1774–81.
611. Grolmusz VK, Borka K, Kövesdi A, Németh K, Balogh K, Dékány C, et al. MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN1 syndrome-associated primary hyperparathyroidism. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 2017;
612. Swarts DR, Scarpa A, Corbo V, Van Criekinge W, van Engeland M, Gatti G, et al. MEN1 gene mutation and reduced expression are associated with poor prognosis in pulmonary carcinoids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E374–8.
613. Vijayaraghavan J, Maggi EC, Crabtree JS. miR-24 regulates menin in the endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307:E84–92.
614. Luzi E, Marini F, Giusti F, Galli G, Cavalli L, Brandi ML. The negative feedback-loop between the oncomir Mir-24-1 and menin modulates the Men1 tumorigenesis by mimicking the “Knudson’s second hit.” *PLoS One*. 2012;7:e39767.

VIII.. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

VIII.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben

A PhD fokozat elnyeréséig született közlemények (2005-ig)

1. Patócs A, Rác K
Pheochromocytoma
HIPPOCRATES (BP) 3:(6) pp. 354-356. (2001)
2. **Patócs A**, Tóth M, Barta CS, Sasvári-Székely M, Varga I, Szűcs N, Jakab CS, Gláz E, Rác K
Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas
EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 147:(3) pp. 349-355. (2002)
Független idéző: 22 Függő idéző: 4 Összesen: 26 **IF: 2.560**
3. **Patocs A**, Valkusz Z, Igaz P, Balogh K, Toth M, Varga I, Racz K
Segregation of the V804L mutation and S836S polymorphism of exon 14 of the RET gene in an extended kindred with familial medullary thyroid cancer.
CLINICAL GENETICS 63:(3) pp. 219-223. (2003)
Független idéző: 11 Függő idéző: 3 Összesen: 17 **IF: 2.025**
4. **Patocs A**, Karadi E, Toth M, Varga I, Szucs N, Balogh K, Majnik J, Glaz E, Racz K
Clinical and biochemical features of sporadic and hereditary pheochromocytomas: an analysis of 41 cases investigated in a single endocrine centre
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PREVENTION 13:(5) pp. 403-409. (2004)
Független idéző: 15 Függő idéző: 6 Összesen: 21 **IF: 1.785**

PhD fokozat elnyerése (2005) után született közlemények:

5. Balogh K, **Patocs A**, Majnik J, Racz K, Hunyady L
Genetic screening methods for the detection of mutations responsible for multiple endocrine neoplasia type 1
MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM 83:(1-2) pp. 74-81. (2004)
Független idéző: 29 Függő idéző: 3 Összesen: 32 **IF: 2.502**
6. Balogh K, Patocs A, Majnik J, Varga F, Illyes G, Hunyady L, Racz K
Unusual presentation of multiple endocrine neoplasia type 1 in a young woman with a novel mutation of the MEN1 gene
JOURNAL OF HUMAN GENETICS 49:(7) pp. 380-386. (2004)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 **IF: 2.316**
7. Majnik J, **Patocs A**, Balogh K, Toth M, Racz K
A rapid and simple method for detection of Asn363Ser polymorphism of the human glucocorticoid receptor gene
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 92:(5) pp. 465-468. (2004)
Független idéző: 12 Függő idéző: 9 Összesen: 21 **IF: 2,715**
8. Gergics P, **Patocs A**, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, Racz K
Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 100:(4-5) pp. 161-166. (2006)
Független idéző: 12 Függő idéző: 6 Összesen: 18 **IF: 2.825**
9. Majnik J, **Patocs A**, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, Mondok A, Borgulya G, Panczel P, Prohaszka Z, Racz K
Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas
JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 91:(7) pp. 2796-2799. (2006)
Független idéző: 17 Függő idéző: 3 Összesen: 20 **IF: 5.799**
10. **Patocs A**, Klein I, Szilvasi A, Gergics P, Toth M, Valkusz Z, Forizs E, Igaz P, Al-Farhat Y, Tordai A, Váradi A, Racz K, Ésik O
Genotype-phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer
WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE 118:(13-14) pp. 417-421. (2006)
Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12 **IF: 0,804**
11. Balogh K, Racz K, **Patocs A**, Hunyady L
Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function

- TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM** 17:(9) pp. 357-364. (2006)
Független idéző: 64 Függő idéző: 1 Összesen: 65 **IF: 7.066**
12. Zbuk KM, **Patocs A**, Shealy A, Sylvester H, Miesfeldt S, Eng C
Germline mutations in PTEN and SDHC in a woman with epithelial thyroid cancer and carotid paraganglioma
NATURE CLINICAL PRACTICE ONCOLOGY 4:(10) pp. 608-612. (2007)
Független idéző: 19 Összesen: 19 **IF: 8.217**
13. Balogh K, Hunyady L, **Patocs A**, Gergics P, Valkusz Z, Toth M, Racz K
MEN1 gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 67:(5) pp. 727-734. (2007)
Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12 **IF: 3.370**
14. **Patocs A**, Gergics P, Balogh K, Toth M, Fazakas F, Liko I, Racz K
Ser80Ile mutation and a concurrent Pro25Leu variant of the VHL gene in an extended Hungarian von Hippel-Lindau family
BMC MEDICAL GENETICS 9: Paper 29. 8 p. (2008)
Független idéző: 7 Függő idéző: 1 Összesen: 8 **IF: 2.762**
15. Milos IN, Frank-Raue K, Wohllk N, Maia AL, Pusiol E, **Patocs A**, Robledo M, Biarnes J, Barontini M, Links TP, de Groot JW, Dvorakova S, Peczkowska M, Rybicki LA, Sullivan M, Raue F, Zosin I, Eng C, Neumann HPH
Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation
ENDOCRINE-RELATED CANCER 15:(4) pp. 1035-1041. (2008)
Független idéző: 14 Függő idéző: 13 Összesen: 27 **IF: 5.236**
16. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T, **Patocs A**, Lobo G, Edelman E, Platzer P, Orloff MS, Waite KA, Eng C
Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes
AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 83:(2) pp. 261-268. (2008)
Független idéző: 90 Függő idéző: 30 Összesen: 120 **IF: 10.153**
17. **Patocs A**, Balogh K, Racz K
Adrenal tumors in MEN1 syndrome and the role of menin in adrenal tumorigenesis
ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY 668: pp. 97-103. (2009) **IF: 2.020**
18. Gergics P, **Patócs A**, Tóth M, Igaz P, Szücs N, Liko I, Fazakas F, Szabó I, Kovács B, Gláz E, Rácz K
Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel-Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas
EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 161:(3) pp. 495-502. (2009)
Független idéző: 7 Függő idéző: 5 Összesen: 12 **IF: 3.539**
19. Balogh K, **Patócs A**, Hunyady L, Rácz K
Menin dynamics and functional insight: Take your partners.
MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY 326:(1-2) pp. 80-84. (2010)
Független idéző: 26 Összesen: 26 **IF: 4.119**
20. Boyle B; Butz H; Liko I; Zalatnai A; Szabó PM; Tóth M; Feldman K; Lendvai N; Bertalan R; Szücs N; Igaz P; Rácz K; **Patócs A**
Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas
STEROIDS 75: (10) pp. 695-700 (2010)
Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10 **IF: 3.106**
21. Butz H; Liko I; Czirják S; Igaz P; Korbonits M; Bálint K; Rácz K; **Patócs A**
Downregulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNAs in human sporadic pituitary adenomas
J CLIN ENDOCRINOL METAB 95:(10) pp. E181-E191. (2010)
Független idéző: 44 Függő idéző: 12 Összesen: 56 **IF: 6.495**
22. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, Toledo SP, Toledo RA, Tavares MR, Alevizaki M, Mian C, Siggelkow H, Hüfner M, Wohllk N, Opocher G, Dvořáková S, Bendlova B, Czetwertynska M, Skasko E, Barontini M, Sanso G, Vorländer C, Maia AL, **Patocs A**, Links TP, de Groot JW, Kerstens MN, Valk GD, Miehle K, Musholt TJ, Biarnes J, Damjanovic S, Muresan M, Wüster C, Fassnacht M, Peczkowska M, Fauth C, Golcher H, Walter MA, Pichl J, Raue F, Eng C, Neumann HP; International RET Exon 10 Consortium.
Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10.
HUMAN MUTATION 32:(1) pp. 51-58. (2011)
Független idéző: 36 Függő idéző: 24 Összesen: 60 **IF: 5.686**
23. Butz H; Liko I; Czirják S; Igaz P; Korbonits M; Rácz K; **Patócs A**:
MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFβ pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas
PITUITARY 14:(2) pp. 112-124. (2011)

- Független idéző: 40 Függő idéző: 11 Összesen: 51 **IF: 1,830**
24. Lendvai N, Tóth M, Valkusz Z, Bekő G, Szücs N, Csajbók É, Igaz P, Kriszt B, Kovács B, Rácz K, **Patócs A**
Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome
CLINICS 67:(S1) pp. 85-89. (2012)
Független idéző: 2 Összesen: 2 **IF: 0**
 25. Banlaki Z, Raizer G, Acs B, Majnik J, Doleschall M, Szilagyi A, Racz K, Fust G, **Patocs A**
ACTH-induced cortisol release is related to the copy number of the C4B gene encoding the fourth component of complement in patients with non-functional adrenal incidentaloma Patients with Non-functional Adrenal Incidentaloma.
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 76:(4) pp. 478-484. (2012)
Független idéző: 1 Függő idéző: 3 Összesen: 4 **IF: 3,396**
 26. Butz H, Rácz K, Hunyady L, **Patócs A**
Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery
TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES 33:(7) pp. 382-393. (2012)
Független idéző: 59 Összesen: 59 **IF: 9,25**
 27. Szabó PM, Butz H, Igaz P, Rácz K, Hunyady L, **Patócs A**
Minireview: MIRomics in Endocrinology: A Novel Approach for Modeling Endocrine Diseases.
MOLECULAR ENDOCRINOLOGY 27:(4) pp. 573-585. (2013)
Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9 **IF: 4,201**
 28. Castinetti F, Qi XP, Walz MK, Maia AL, Sanso G, Peczkowska M, Hasse-Lazar K, Links TP, Dvorakova S, Toledo RA, Mian C, Bugalho MJ, Wohllk N, Kollyukh O, Canu L, Loli P, Bergmann SR, Costa JB, Makay O, **Patocs A**, Pfeifer M, Shah NS, Cuny T, Brauckhoff M, Bausch B, von Dobschuetz E, Letizia C, Barczynski M, Alevizaki MK, Czetwertynska M, Ugurlu MU, Valk G, Plukker JT, Sartorato P, Siqueira DR, Barontini M, Szperl M, Jarzab B, Verbeek HH, Zelinka T, Vlcek P, Toledo SP, Coutinho FL, Mannelli M, Recasens M, Demarquet L, Petramala L, Yaremchuk S, Zabolotnyi D, Schiavi F, Opocher G, Racz K, Januszewicz A, Weryha G, Henry JF, Brue T, Conte-Devolx B, Eng C,
Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study.
LANCET ONCOLOGY 15:(6) pp. 648-655. (2014)
Független idéző: 12 Függő idéző: 7 Összesen: 19 **IF: 24,690**
 29. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P, Eisenhofer G, **Patocs A**, Veech RL, Pacak K
Succinate-to-Fumarate Ratio as a New Metabolic Marker to Detect the Presence of SDHB/D-related Paraganglioma: Initial Experimental and Ex Vivo Findings.
ENDOCRINOLOGY 155:(1) pp. 27-32. (2014)
Független idéző: 12 Függő idéző: 9 Összesen: 21 **IF: 4,503**
 30. Doleschall M, Szabo JA, Pazmandi J, Szilagyi A, Koncz K, Farkas H, Toth M, Igaz P, Glaz E, Prohaszka Z, Korbonits M, Racz K, Fust G, **Patocs A**
Common Genetic Variants of the Human Steroid 21-Hydroxylase Gene (CYP21A2) Are Related to Differences in Circulating Hormone Levels.
PLOS ONE 9:(9) p. e107244. (2014)
Független idéző: 4 Összesen: 4 **IF: 3,234**
 31. Bausch B, Wellner U, Bausch D, Schiavi F, Barontini M, Sanso G, Walz MK, Peczkowska M, Weryha G, Dall'igna P, Cecchetto G, Bisogno G, Moeller L, Bockenhauer D, **Patocs A**, Racz K, Zabolotnyi D, Yaremchuk S, Dzivite-Krisane I, Castinetti F, Taieb D, Malinoc A, von Dobschuetz E, Roessler J, Schmid KW, Opocher G, Eng C, Neumann HP
Long term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma.
ENDOCRINE-RELATED CANCER 21:(1) pp. 17-25. (2014)
Független idéző: 14 Függő idéző: 2 Összesen: 16 **IF: 4,805**
 32. Igaz I, Nyíró G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rácz K, Igaz P, **Patócs A**
Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin
INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2015: Paper 89230. 6 p. (2015) **IF: 2,376**
Független idéző: 2 Összesen: 2
 33. Grolmusz VK, Toth EA, Baghy K, Liko I, Darvasi O, Kovalszky I, Matko J, Racz K, **Patocs A**
Fluorescence activated cell sorting followed by small RNA sequencing reveals stable microRNA expression during cell cycle progression.
BMC GENOMICS 17:(1) Paper 412. 16 p. (2016) **IF: 3,729**
Függő idéző: 1 Összesen: 1
 34. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rácz K, Igaz P, **Patócs A**
Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer

- AMERICAN J CANCER RESEARCH** 6(9) pp. 2041-2053. (2016) **IF: 3,425***
35. **Patocs A**, Lendvai NK, Butz H, Liko I, Sapi Z, Szucs N, Toth G, Grolmusz VK, Igaz P, Toth M, Racz K
Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with pheochromocytoma / Paraganglioma Syndrome.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 22:673-679 (2016) **IF: 1,940***
Független idéző: 1 Összesen: 1
36. Butz H, Kinga N, Racz K, **Patocs A**
Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders.
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 39:(1) pp. 1-10. (2016) **IF: 1.994***
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
37. Tretter L, **Patocs A**, Chinopoulos C
Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis.
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS 1857:(8) pp. 1086-1011 (2016.)
Független idéző: 6 Összesen: 6
38. Nagy Z, Marta A, Butz H, Liko I, Racz K, **Patocs A**
Modulation of the circadian clock by glucocorticoid receptor isoforms in the H295R cell line.
STEROIDS 116: pp. 20-27. (2016) **IF: 2,513***
39. Nagy Z, Acs B, Butz H, Feldman K, Marta A, Szabo PM, Baghy K, Pazmany T, Racz K, Liko I, **Patocs A**
Overexpression of GR β in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease.
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 155:(Pt A) pp. 76-84. (2016)
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 **IF: 3,985***
40. Bausch B, Schiavi F, Ni Y, Welander J, **Patocs A**, Ngeow J, Wellner U, Malinoc A, Taschin E, Barbon G, Lanza V, Soderkvist P, Stenman A, Larsson C, Svahn F, Chen JL, Marquard J, Fraenkel M, Walter MA, Peczkowska M, Prejbisz A, Jarzab B, Hasse-Lazar K, Petersenn S, Moeller LC, Meyer A, Reisch N, Trupka A, Brase C, Galiano M, Preuss SF, Kwok P, Lendvai N, Berisha G, Makay O, Boedeker CC, Weryha G, Racz K, Januszewicz A, Walz MK, Gimm O, Opocher G, Eng C, Neumann HP
Clinical Characterization of the Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for Gene-Informed Prevention.
JAMA ONCOLOGY 3: Paper 2017.0223. (2017)
41. Butz H, Nemeth K, Czenke D, Liko I, Czirjak S, Zivkovic V, Baghy K, Korbonits M, Kovalszky I, Igaz P, Racz K, **Patocs A**
Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 23:(3) pp. 633-641. (2017) **IF: 1,940****
42. Grolmusz VK, Borka K, Kövesdi A, Németh K, Balogh K, Dékány Cs, Kiss A, Szentpéteri A, Sárman B, Somogyi A, Csajbók É, Valkusz Z, Tóth M, Igaz P, Rácz K, **Patócs A**
MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN-1 syndrome associated primary hyperparathyroidism
VIRCHOWS ARCHIV 470: Paper 017-2158-3. 11 p. (2017) **IF: 2.627****

VIII.2. Magyar nyelvű folyóiratscikkek:

- Balogh K, Hunyady L, **Patocs A**, Valkusz Z, Bertalan R, Gergics P, Majnik J, Toke J, Toth M, Szucs N, Glaz E, Futo L, Horanyi J, Racz K, Tulassay Z
Az 1-es típusú multiplex endokrin neoplasia klinikai tünetei, diagnózisa és kezelése. A genetikai vizsgálatok hazai tapasztalatai
ORVOSI HETILAP 146:(43) pp. 2191-2197. (2005)
Függő idéző: 2 Összesen: 2
- Bertalan R, Patócs A, Balogh K, Tőke J, Boyle B, Tóth M, Kiss R, Varga I, Gláz E, Rácz K, Tulassay Zs
A phaeochromocytoma örökletes formáinak klinikai és genetikai szűrése
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 59:(2) pp. 103-108. (2006)
- Patócs A**, Balogh K, Varga I, Tóth M, Békési G, Gláz E, Rácz K, Tulassay ZS
A PTEN tumorsuppresszor gén szerepe endokrin és nem endokrin daganatokban
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 413-417. (2007)
- Sallai Á; Igaz P; **Patócs A**; Gergics P; Rácz K; Fekete G
Profilaktikus thyreoidectomia gyermekkorban
GYERMEKGYÓGYÁSZAT 59, 109-113 (2008)
- Butz H, Liko I, Boyle B, Lendvai N, Igaz P, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, **Patócs A**
A mikro-RNS-kutatás módszerei és alkalmazásuk hypophysis daganatokban
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 62:(5) pp. 355-362. (2009)
- Gergics P, Toke J, Szilágyi A, Szappanos A, Kender Z, Barta G, Tóth M, Igaz P, Rácz K, **Patócs A**
A nagy géndeletiók kimutatásának módszerei és alkalmazásuk egyes örökletes betegségekben

- ORVOSI HETILAP** 150:(50) pp. 2258-2264. (2009)
Független idéző: 2 Összesen: 2
7. Lendvai Nikolett, Szabó Ildikó, Butz Henriett, Bekő Gabriella, Horányi János, Tarjányi Mária, Alföldi Sándor, Szabó István, Rácz Károly, **Patócs A**
SDHD génmutációhoz társult extraadrenális phaeochromocytoma [Extra-adrenal pheochromocytoma associated to SDHD gene mutation]
ORVOSI HETILAP 150:(14) pp. 645-649. (2009)
Független idéző: 1 Összesen: 1
8. **Patócs A**, Vásárhelyi Barna, Butz Henriett
Mikro-RNS-ek a laboratóriumi diagnosztikában
ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 19:(9) pp. 17-24. (2012)
9. Tőke Judit, Balog Beatrice, Csöregy Éva, Jakab Zsuzsa, Dabasi Gabriella, **Patócs Attila**, Rácz Károly, Tóth Miklós
Malignus phaeochromocytoma esete - 47 éve tartó kórtörténet
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(6) pp. 412-417. (2014)
10. Tőke J, Czirják G, Tóth M, Rácz K, **Patócs A**
Biokémiai markerek jelentősége a neuroendokrin daganatok felismerésében és a betegek követésében
ORVOSI HETILAP 155:(45) pp. 1775-1782. (2014)
Függő idéző: 1 Összesen: 1
11. Balog B, Tőke J, Róna K, Szücs N, Igaz P, Pusztai P, Sárman B, Gláz E, Kiss R, **Patócs A**, Rácz K, Toth M
A laboratóriumi diagnosztika eredményei az elmúlt 20 évben kórismézett 155 phaeochromocytoma/paraganglioma szindrómás beteg adatainak elemzése alapján.
ORVOSI HETILAP 156:(16) pp. 626-635. (2015)
12. **Patócs A**, Liko I, Butz H, Baghy K, Rácz K
Új módszertani lehetőségek és ezek alkalmazása a hormonális rendszer daganatainak genetikai kivizsgálásában
ORVOSI HETILAP 156:(51) pp. 2063-2069. (2015)
13. **Patócs A**, Igaz P, Tőke J, Lendvai N, Sarkadi B, Grolmusz V, Butz H, Tóth G, Németh K, Gláz E, Kiss R, Pusztai P, Sárman B, Reismann P, Szücs N, Tóth M, Rácz K
Örökletes phaeochromocytomák és paragangliomák molekuláris genetikai vizsgálatával szerzett hazai tapasztalatok
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 69: pp. 83-92. (2016)
14. Tóth Géza, **Patócs Attila**, Tóth Miklós
Ikerpárban előforduló örökletes phaeochromocytoma: [Hereditary phaeochromocytoma in twins]
ORVOSI HETILAP 157:(33) pp. 1326-1330. (2016) **IF: 0.291***

VIII.3. Az értekezéshez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások:

1. Igaz P, **Patócs A**, Rácz K:
Uncommon MEN2A phenotype in a patient with a RET protooncogene exon 10, codon 611 mutation. [Letter to the Editor]
CLIN ENDOCRINOL 71, 304-305 (2009)
Függő idéző: 1 Összesen: 1

VIII.4. Az értekezéshez s munkához kapcsolódó könyvfejezetek:

1. Balogh K, **Patócs A** (szerk.)
SuperMEN1: Pituitary, Parathyroid and Pancreas
New York: Landes Bioscience; Springer Science+Business Media, 136 p. (2009).
(Advances in experimental medicine and biology; 668.) ISBN:[978-1-4419-1662-4](#))
2. **Patócs Attila**
Endokrin rendszer laboratóriumi vizsgálata
In: Bekő Gabriella, Patócs Attila, Prohászka Zoltán, Sárváry Enikő, Szabó Antal, Vásárhelyi B, Szabó Antal (szerk.)
Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek: Egyetemi jegyzet. 264 p. Budapest: Semmelweis Kiadó, 2010. pp. 177-193. ISBN:9789639879751) (2010)
3. **Patócs Attila**
Molekuláris biológiai vizsgálatok
In: Bekő Gabriella, Patócs Attila, Prohászka Zoltán, Sárváry Enikő, Szabó Antal, Vásárhelyi B, Szabó Antal (szerk.)
Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek: Egyetemi jegyzet. 264 p. Budapest: Semmelweis Kiadó, 2010. pp. 195-204. ISBN:9789639879751) (2010)
4. **Patócs Attila:**

Multiplex endokrin neoplasiák és egyéb örökletes endokrin tumor szindrómák In: Leövey A, Nagy VE, Paragh G, Rácz K (szerk.) Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve
Budapest: Medicina Könyvkiadó, pp. 447-464. (ISBN:978-963-226-277-2 (2011.))

5. Henriett Butz, Károly Rácz, **Attila Patócs**
Epigenetic and Posttranscriptional Alterations of Tumor Suppressor Genes in Sporadic Pituitary Adenomas
In: Yue Cheng (szerk.)
TUMOR SUPPRESSOR GENES. 331 p.
Rijeka: InTech Open Access Publisher, pp. 221-246. ISBN:978-953-307-879-3) (2012)
6. **Patócs Attila:**
A fej-nyak régiót érintő, örökletes betegségek
In: Tulassay Zs, Békési G, Rácz K (szerk.) **A belgyógyászat alapjai fogorvosok számára.** 544 p. Budapest: Medicina, pp. 391-400. ISBN:978 963 226 467 7) (2014)
7. Butz H, **Patócs A.**
Technical Aspects Related to the Analysis of Circulating microRNAs.
EXS. 2015;106:55-71. doi: 10.1007/978-3-0348-0955-9_3. (2015)

VIII.5. Az értékezésben nem tárgyalt további nemzetközi és hazai közlemények időrendben

1. Rácz K, Toth M, **Patócs A**, Glaz E
Incidentally discovered adrenal masses.
ENDOKRYNOLOGIA POLSKA 51:(1) pp. 85-88. (2000)
2. Szucs N, Varga I, Jakab C, **Patócs A**, Glaz E, Toth M, Kiss R, Rácz K
Leptin inhibits cortisol and corticosterone secretion in pathologic human adrenocortical cells
PITUITARY 4:(1-2) pp. 71-77. (2001)
Független idéző: 13 Összesen: 13
3. Igaz P, Pap E, **Patócs A**, Falus A, Tulassay Z, Rácz K
Genomics of steroid hormones: in silico analysis of nucleotide sequence variants (polymorphisms) of the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of steroid hormones.
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 82:(4-5) pp. 359-367. (2002)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 IF: 2.637
4. Igaz P, Patócs A, Rácz K, Klein I, Varadi A, Esik O
Occurrence of pheochromocytoma in a MEN2A family with codon 609 mutation of the RET proto-oncogene
JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 87:(6) p. 2994. (2002)
Független idéző: 18 Függő idéző: 1 Összesen: 19 IF: 5.199
5. Igaz P, **Patócs A**, Rácz K
Novel sequence variants of the genes associated with the multiple endocrine neoplasia syndromes 1 and 2.
analysis by an "in silico approach."
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 25:(7) pp. 609-613. (2002) IF: 1.476
6. Speer G, Tóth M, Niller HH, Salamon D, Takács I, Miheller P, **Patócs A**, Nagy Z, Bajnok E, Nyíri P, Lakatos P
Calcium metabolism and endocrine functions in a family with familial hypocalciuric hypercalcaemia
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 111:(8) pp. 486-490. (2003)
Független idéző: 7 Összesen: 7 IF: 1.956
7. Tóth M, Speer G, Patócs A, Salamon D, Lakatos P, Rácz K, Tulassay ZS
Familiáris hypocalciuriás hypocalcaemia
ORVOSI HETILAP 144:(41) pp. 2029-2031. (2003)
8. Szucs N, Varga I, **Patócs A**, Toth M, Glaz E, Rácz K
Secretion of 6beta-hydroxycortisol by normal human adrenals and adrenocortical adenomas
STEROIDS 68:(5) pp. 477-482. (2003)
Független idéző: 3 Összesen: 3 IF: 2.444
9. Szucs N, Varga I, **Patócs A**, Toth M, Jakab C, Glaz E, Rácz K
Plasma 6beta-hydroxycortisol measurements for assessing altered hepatic drug metabolizing enzyme activity
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 90:(3) pp. 217-223. (2003)
Független idéző: 2 Összesen: 2
10. Varga I, Jakab C, Szucs N, **Patócs A**, Toth M, Kiss R, Glaz E, Rácz K
Plasma and salivary 6beta-hydroxycortisol measurements for assessing adrenocortical activity in patients with adrenocortical adenomas
HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 35:(7) pp. 421-426. (2003)
Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 1.669
11. Csákváry V, Tóth M, Patócs A, Varga I, Oroszlán G, Rácz K
A kalciumérzékelő receptor génjének de novo heterozigóta R551K pontmutációja és A986S polimorfizmusa újszülöttkori súlyos primer hyperparathyreosisban

- CA ÉS CSONT** 7:(4) pp. 141-145. (2004)
12. Liko I, Igaz P, **Patocs A**, Toth S, Pazmany T, Toth M, Racz K
Sequence variants of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor gene and their functional consequences on the three-dimensional protein structure
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 11:(24) pp. 3229-3237. (2004)
Független idéző: 1 Függő idéző: 3 Összesen: 4 IF: 4.382
 13. Majnik J, Szucs N, **Patocs A**, Toth M, Balogh K, Varga I, Glaz E, Racz K
Effect of single doses of dexamethasone and adrenocorticotrop hormone on serum bone markers in healthy subjects and in patients with adrenal incidentalomas and Cushing's syndrome
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 27:(8) pp. 747-753. (2004)
Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5 IF: 1.525
 14. **Patocs A**, Liko I, Varga I, Gergics P, Boros A, Futo L, Kun I, Bertalan R, Toth S, Pazmany T, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Glaz E, Racz K
Novel mutation of the CYP17 gene in two unrelated patients with combined 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency: demonstration of absent enzyme activity by expressing
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 97:(3) pp. 257-265. (2005)
Független idéző: 20 Összesen: 20 IF: 2.866
 15. Sweet K, Willis J, Zhou XP, Gallione C, Sawada T, Alhopuro P, Khoo SK, **Patocs A**, Martin C, Bridgeman S, Heinz J, Pilarski R, Lehtonen R, Prior TW, Frebourg T, Teh BT, Marchuk DA, Aaltonen LA, Eng C
Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis
JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 294:(19) pp. 2465-2473. (2005)
Független idéző: 143 Függő idéző: 26 Összesen: 169 IF: 23.494
 16. Halasz Z, Toke J, **Patocs A**, Bertalan R, Tombol Z, Sallai A, Hosszu E, Muzsnai A, Kovacs L, Solyom J, Fekete G, Racz K
High prevalence of PROP1 gene mutations in Hungarian patients with childhood-onset combined anterior pituitary hormone deficiency.
ENDOCRINE 30:(3) pp. 255-260. (2006)
Független idéző: 13 Függő idéző: 2 Összesen: 15 IF: 1.805
 17. Weber F, Shen L, Fukino K, **Patocs A**, Mutter GL, Caldes T, Eng C
Total-genome analysis of BRCA1/2-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation
AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 78:(6) pp. 961-972. (2006)
Független idéző: 56 Függő idéző: 8 Összesen: 64 IF: 12.629
 18. Fukino K, Shen L, **Patocs A**, Mutter GL, Eng C
Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma
JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 297:(19) pp. 2103-2111. (2007)
Független idéző: 86 Függő idéző: 5 Összesen: 91 IF: 25.547
 19. **Patocs A**, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C
Breast-Cancer Stromal Cells with TP53 Mutations and Nodal Metastases
NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 357:(25) pp. 2543-2551. (2007)
Független idéző: 201 Függő idéző: 6 Összesen: 207 IF: 52.589
 20. Mercado M, Borges F, Bouterfa H, Chang T -C, Chervin A, Farrall A J, **Patocs A**, Petersenn S, Podoba J, Safari M, Wardlaw J, on behalf of the SMS995B2401 Study Group
A prospective, multicentre study to investigate the efficacy, safety and tolerability of octreotide LAR? (long-acting repeatable octreotide) in the primary therapy of patients with acromegaly
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 66:(6) pp. 859-868. (2007)
Független idéző: 116 Függő idéző: 21 Összesen: 137 IF: 3.370
 21. Toke J, Czirjak G, **Patocs A**, Enyedi B, Gergics P, Csakvary V, Enyedi P, Toth M
Neonatal severe hyperparathyroidism associated with a novel de novo heterozygous R551K inactivating mutation and a heterozygous A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 67:(3) pp. 385-392. (2007)
Független idéző: 18 Függő idéző: 1 Összesen: 19 IF: 3.370
 22. Tóth M, Tőke J, Horányi J, Stenczer B, **Patócs A**, Balogh K, Jakab ZS, Szűcs N, Gergics P, Varga I, Rác K, Tulassay ZS
A sporadikus és familiáris primer hyperparathyreosis klinikai és laboratóriumi jellemzői
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(2) pp. 154-159. (2007)
 23. Tőke J, Tóth M, **Patócs A**, Bertalan R, Gergics P, Stenczer B, Speer G, Lakatos P, Rác K, Tulassay Zs
A kalcium-szenzor gén mutációvizsgálatának hazai tapasztalatai
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 451-454. (2007)
 24. Weber F, Xu Y, Zhang L, **Patocs A**, Shen L, Platzer P, Eng C

- Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma
JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 297:(2) pp. 187-195. (2007)
 Független idéző: 59 Függő idéző: 9 Összesen: 68 IF: 25.547
25. Bekő G, Krkos K, Rácz K, **Patócs A**, Tulassay Zs
 A szérum inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I) referenciatartományának vizsgálata
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61:(5) pp. 400-405. (2008)
26. Bertalan R, **Patocs A**, Vasarhelyi B, Treszl A, Varga I, Szabo E, Tamas J, Toke J, Boyle B, Nobilis A, Rigo J Jr, Racz K
 Association between birth weight in preterm neonates and the BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene.
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 111:(1-2) pp. 91-94. (2008)
 Független idéző: 11 Összesen: 11 IF: 2.827
27. Boyle B, Korányi K, **Patocs A**, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, Racz K, Balazs C
 Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy
BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY 92:(1) pp. 131-134. (2008)
 Független idéző: 12 Függő idéző: 4 Összesen: 16 IF: 2.859
28. Fütő J, Tőke J, **Patócs A**, Szappanos Á, Varga I, Gláz E, Tulassay ZS, Rácz K, Tóth M
 Skeletal differences in bone mineral area and content before and after cure of endogenous Cushing's syndrome
OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL 19:(7) pp. 941-949. (2008)
 Független idéző: 23 Függő idéző: 4 Összesen: 27 IF: 4.290
29. Halász Z, Bertalan R, Toke J, **Patócs A**, Tóth M, Fekete G, Gláz E, Rácz K
 Laterality disturbance and hypopituitarism. A case report of co-existing situs inversus totalis and combined pituitary hormone deficiency
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 31:(1) pp. 74-78. (2008)
 Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5 IF: 1.888
30. Bertalan R, **Patocs A**, Boyle B, Rigo J Jr, Racz K
 The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy
GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY 25:(6) pp. 379-382. (2009)
 Független idéző: 4 Összesen: 4 IF: 1.360
31. Bertalan R, **Patocs A**, Nagy B, Derzsy Z, Gullai N, Szappanos A, Rigo J Jr, Racz K
 Overrepresentation of BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene in pregnant women with HELLP syndrome.
CLINICA CHIMICA ACTA 405:(1-2) pp. 148-152. (2009)
 Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7 IF: 2.535
32. Lócsei Z, Rácz K, **Patocs A**, Kovacs GL, Toldy E
 Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration
CLINICA CHIMICA ACTA 402:(1-2) pp. 203-205. (2009)
 Független idéző: 13 Függő idéző: 1 Összesen: 14 IF: 2.535
33. Mondok Á, Tóth M, **Patócs A**, Szücs N, Igaz P, Pusztai P, Czirják S, Bekő G, Gláz E, Rácz K, Tulassay ZS
 A szomatosztatinanalóg kezelés eredményei acromegáliában
ORVOSI HETILAP 150:(31) pp. 1457-1462. (2009)
34. Mondok A, Varga I, Glaz E, Szucs N, Toth M, **Patocs A**, Beko G, Racz K
 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in acromegalic patients with normal or impaired carbohydrate metabolism
STEROIDS 74:(9) pp. 725-729. (2009)
 Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 2.905
35. Szabó PM, Wiener Z, Tömböl Z, Kovács A, Pócza P, Horányi J, Kulka J, Riesz P, Tóth M, **Patócs A**, Gaillard RC, Falus A, Rácz K, Igaz P
 Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors.
VIRCHOWS ARCHIV 455:(2) pp. 133-142. (2009)
 Független idéző: 8 Összesen: 8 IF: 2.305
36. Szappanos A, **Patócs A**, Tőke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Likó I, Rácz K, Tóth M
 BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 71:(5) pp. 636-643. (2009)
 Független idéző: 23 Függő idéző: 4 Összesen: 27 IF: 3.201
37. Tömböl Z, Szabó P, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, **Patócs A**, Likó I, Gaillard R, Falus A, Rácz K, Igaz P
 Integrative molecular-bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue specific target prediction and pathway analysis.

- ENDOCRINE-RELATED CANCER** 16:(3) pp. 895-906. (2009)
Független idéző: 76 Függő idéző: 21 Összesen: 97 IF: 4.282
38. Beko G, Varga I, Glaz E, Sereg M, Feldman K, Toth M, Racz K, **Patocs A**
Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods
CLINICA CHIMICA ACTA 411:(5-6) pp. 364-367. (2010)
Független idéző: 26 Függő idéző: 1 Összesen: 27 IF: 2.389
39. Halászlaki C, Horváth H, Kiss L, Takács I, Speer G, Nagy Z, Winternitz T, Dabasi G, Zalatnai A, **Patócs A**, Lakatos P
Verner-Morrison szindróma egy esete [Verner-Morrison syndrome: a case study]
ORVOSI HETILAP 151:(27) pp. 1111-1114. (2010)
Független idéző: 1 Összesen: 1
40. Pregon I, Herszényi L, Juhász M, Miheller P, **Patócs A**, Rácz K, Tulassay Zs
A szérum kromogranin A szint változásának dinamikája protonpumpa-gátlók hatására
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 63:(4) pp. 281-287. (2010)
41. Rita Bertalan, Ágnes Sallai, János Sólyom, Gábor Lotz, István Szabó, Balázs Kovács, Éva Szabó, **Attila Patócs**, Károly Rácz
Hyperthyroidism caused by germline activating mutation of the thyrotropin receptor gene: difficulties in diagnosis and therapy
THYROID 20:(3) pp. 327-332. (2010)
Független idéző: 7 Összesen: 7 IF: 4.327
42. Szabó PM, Tamási V, Molnár V, Andrásfalvy M, Tömböl Z, Farkas R, Kövesdi K, **Patócs A**, Tóth M, Szalai C, Falus A, Rácz K, Igaz P
Meta-analysis of adrenocortical tumor genomics data: novel pathogenic pathways revealed
ONCOGENE 29:(21) pp. 3163-3172. (2010)
Független idéző: 37 Függő idéző: 10 Összesen: 47 IF: 7.414
43. Szappanos A, Tőke J, Lippai D, **Patócs A**, Igaz P, Szücs N, Fűtő L, Gláz E, Rácz K, Tóth M
Bone turnover in patients with endogenous cushing's syndrome before and after successful treatment.
OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL 21:(4) pp. 637-645. (2010)
Független idéző: 16 Függő idéző: 3 Összesen: 19 IF: 4.859
44. Tömböl Z, Éder K, Kovács A, Szabó P M, Kulka J, Likó I, Zalatnai A, Rácz G, Tóth M, **Patócs A**, Falus A, Rácz K, Igaz P
MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas
MODERN PATHOLOGY 23:(12) pp. 1583-1595. (2010)
Független idéző: 31 Függő idéző: 5 Összesen: 36 IF: 4.176
45. Pregon I, Herszenyi L, Juhasz M, Miheller P, Hritz I, **Patocs A**, Racz K, Tulassay Z
Effect of Proton-Pump Inhibitor Therapy on Serum Chromogranin A Level.
DIGESTION 84:(1) pp. 22-28. (2011)
Független idéző: 19 Függő idéző: 1 Összesen: 20 IF: 2.046
46. Sereg M, Toke J, **Patocs A**, Varga I, Igaz P, Szucs N, Horanyi J, Pusztai P, Czirjak S, Glaz E, Racz K, Toth M
Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome
STEROIDS 76:(1-2) pp. 38-42. (2011)
Független idéző: 23 Függő idéző: 2 Összesen: 25 IF: 2.829
47. Szappanos A, **Patócs A**, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Acs B, Feldmann K, Rácz K, Tóth M
The 83,557insA variant of the gene coding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 123:(1-2) pp. 79-84. (2011)
Független idéző: 3 Függő idéző: 4 Összesen: 7 IF: 3.053
48. Halaszlaki C, Takacs I, **Patocs A**, Lakatos P
Új genetikai mutáció a Carney-komplex-betegség magyarországi esetének hátterében. [Novel mutation in a patient with Carney complex.]
ORVOSI HETILAP 152:(20) pp. 802-804. (2011)
Független idéző: 3 Összesen: 3
49. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Likó I, Kriszt B, Lakatos P, Tóth M, Rácz K, **Patócs A**
The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women.
STEROIDS 77:(13) pp. 1345-1351. (2012)
Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12 IF: 2.803
50. Szabo PM, Pinter M, Szabo DR, Zsippai A, **Patocs A**, Falus A, Racz K, Igaz P
Integrative analysis of neuroblastoma and pheochromocytoma genomics data.

- BMC MEDICAL GENOMICS** 5:(1) Paper 48. 19 p. (2012)
 Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5 IF: 3.466
51. Trivellin G, Butz H, Delhove J, Igreja S, Chahal HS, Zivkovic V, McKay T, **Patócs A**, Grossman AB, Korbonits M
 MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and in vitro inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP).
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 303:(6) pp. E708-E719. (2012)
 Független idéző: 20 Függő idéző: 7 Összesen: 27 IF: 4.514
52. Zsippai A, Szabo DR, Tombol Z, Szabo PM, Eder K, Pallinger E, Gaillard RC, **Patocs A**, Toth S, Falus A, Racz K, Igaz P
 Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study.
PHARMACOGENOMICS 13:(12) pp. 1351-1361. (2012)
 Független idéző: 7 Függő idéző: 2 Összesen: 9 IF: 3.857
53. Balogh P, Szabo A, Katz S, Liko I, **Patocs A**, L Kiss A
 Estrogen Receptor Alpha Is Expressed in Mesenteric Mesothelial Cells and Is Internalized in Caveolae upon Freund's Adjuvant Treatment.
PLOS ONE 8:(11) Paper e79508. 10 p. (2013)
 Független idéző: 3 Függő idéző: 4 Összesen: 7 IF: 3.534
54. Banlaki Z, Szabo JA, Szilagyi A, **Patocs A**, Prohaszka Z, Fust G, Doleschall M
 Intraspecific Evolution of Human RCCX Copy Number Variation Traced by Haplotypes of the CYP21A2 Gene
GENOME BIOLOGY AND EVOLUTION 5:(1) pp. 98-112. (2013)
 Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3 IF: 4.532
55. Bekő G, Butz H, Berta K, Tislér A, Olajos F, Vásárhelyi B, **Patócs A**
 Switching between parathormone (PTH) assays: the impact on the diagnosis of renal osteodystrophy
CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 51:(6) pp. 1251-1256. (2013)
 Független idéző: 3 Összesen: 3 IF: 2.955
56. Grolmusz VK, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, **Patócs A**, Rácz K, Reismann P
 Lack of Association between C385A Functional Polymorphism of the Fatty Acid Amide Hydrolase Gene and Polycystic Ovary Syndrome.
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 121:(6) pp. 338-342. (2013)
 Függő idéző: 1 Összesen: 1 IF: 1.760
57. Bencze A, Szücs N, Igaz P, Leiszter K, Nagy Z, **Patócs A**, Rácz K
 Carcinoid szívbetegecség.
ORVOSI HETILAP 154:(14) pp. 546-550. (2013)
58. Masszi G, Benko R, Csibi N, Horvath EM, Tokes AM, Novak A, Beres NJ, Tarszabo R, Buday A, Repas Cs, Bekesi G, **Patocs A**, Nadasy GyL, Hamar P, Benyo Z, Varbiro Sz
 Endothelial relaxation mechanisms and nitrative stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome
LIFE SCIENCES 93:(4) pp. 133-138. (2013)
 Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6 IF: 2.296
59. Nyirő Gábor, **Patócs Attila**, Tihanyi Mariann, Hartwig Mariann, Tőke Judit, Szücs Nikolette, Jakab Zsuzsa, Bakó Barnabás, Rácz Károly, Tóth Miklós
 A Hyperparathyreosis 2 gén új mutációi látszólag sporadikus előfordulású hyperparathyreosis-állkapocstumor szindrómában
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 66:(5) pp. 285-291. (2013)
60. Szabo JA, Szilagyi A, Doleschall Z, **Patocs A**, Farkas H, Prohaszka Z, Racz K, Fust G, Doleschall M
 Both Positive and Negative Selection Pressures Contribute to the Polymorphism Pattern of the Duplicated Human CYP21A2 Gene.
PLOS ONE 8:(11) Paper e81977. 15 p. (2013)
 Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 IF: 3.534
61. Zsippai A, Szabo PM, Szabo DR, Nagy Z, **Patocs A**, Racz K, Igaz P
 In silico analysis of pathways affected by differentially expressed microRNAs in adrenocortical tumors.
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 36:(11) pp. 1011-1019. (2013)
 Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3 IF: 1.552
62. Butz H, Szabo PM, Nofech-Mozes R, Rotondo F, Kovacs K, Mirham L, Girgis H, Boles D, **Patocs A**, Yousef GM
 Integrative Bioinformatics Analysis Reveals New Prognostic Biomarkers of Clear Cell Renal Cell Carcinoma.
CLINICAL CHEMISTRY 60:(10) pp. 1314-1326. (2014)
 Független idéző: 10 Függő idéző: 3 Összesen: 13 IF: 7.911

63. Erdelyi LS, Balla A, **Patocs A**, Toth M, Varnai P, Hunyady L
Altered agonist sensitivity of a mutant V2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus.
MOLECULAR ENDOCRINOLOGY 28:(5) pp. 634-643. (2014)
Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5 IF: 4.022
64. Grolmusz VK, Acs OD, Feldman-Kovacs K, Szappanos A, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Racz K, **Patocs A**
Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome.
MOLECULAR BIOLOGY REPORTS 41:(9) pp. 5961-5969. (2014)
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 IF: 2.024
65. Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Eder K, Toth S, Buzas EI, Falus A, Kovalszky I, **Patocs A**, Racz K, Igaz P
Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71:(5) pp. 917-932. (2014)
Független idéző: 8 Függő idéző: 3 Összesen: 11 IF: 5.808
66. Szabo DR, Luconi M, Szabo PM, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Nagy Z, Mannelli M, **Patocs A**, Racz K, Igaz P
Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors.
LABORATORY INVESTIGATION 94:(3) pp. 331-339. (2014)
Független idéző: 26 Függő idéző: 7 Összesen: 33 IF: 3.676
67. Al-Aissa Z, Rosta K, Hadarits O, Harreiter J, Zoka A, Bancher-Todesca D, **Patocs A**, Kiss K, Sarman B, Pusztai P, Sziller I, Rigo J, Racz K, Somogyi A, Kautzky-Willer A, Firneisz G
Cord serum dipeptidyl-peptidase 4 activity in gestational diabetes
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 45:(2) pp. 196-203. (2015)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 IF: 2.687
68. Balogh P, Magyar M, Szabo A, Mullner N, Liko I, **Patocs A**, Kiss AL
The subcellular compartmentalization of TGFbeta-RII and the dynamics of endosomal formation during the signaling events: An in vivo study on rat mesothelial cells.
EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY 94:(5) pp. 204-213. (2015)
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 IF: 4.011
69. Balogh P, Szabó A, Likó I, **Patócs A**, Kiss AL
Autophagy may contribute to the recovery of rat mesothelium following acute inflammation in vivo.
CELL AND TISSUE RESEARCH 362:(1) pp. 127-137. (2015)
Függő idéző: 1 Összesen: 1 IF: 2.948
70. Butz H, Szabo PM, Khella HW, Nofech-Mozes R, **Patocs A**, Yousef GM
miRNA-target network reveals miR-124as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1.
ONCOTARGET 6:(14) pp. 12543-12557. (2015)
Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7 IF: 5.008
71. Labadi A, Grassi ES, Gellen B, Kleinau G, Biebertmann H, Ruzsa B, Gelmini G, Rideg O, Miseta A, Kovacs GL, **Patocs A**, Felszeghy E, Nagy EV, Mezosi E, Persani L
Loss-of-Function Variants in a Hungarian Cohort Reveal Structural Insights on TSH Receptor Maturation and Signaling
JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 100:(7) pp. E1039-E1045. (2015)
Függő idéző: 2 Összesen: 2 IF: 5.531
72. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás E, Micsik T, Nyirő G, Rác G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradsky KF, Rác K, **Patócs A**, Igaz P
Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model
AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH 5:(12) pp. 3645-3658. (2015)
Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4 IF: 3.425
73. Szelényi Z, Fazakas Á, Szénási G, Kiss M, Tegze N, Fekete BC, Nagy E, Bodó I, Nagy B, Molvarec A, **Patócs A**, Pepó L, Prohászka Z, Vereckei A
Inflammation and oxidative stress caused by nitric oxide synthase uncoupling might lead to left ventricular diastolic and systolic dysfunction in patients with hypertension
JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY 12:(1) pp. 1-10. (2015)
Független idéző: 6 Függő idéző: 2 Összesen: 8 IF: 1.393
74. Farago N, Kocsis AK, Brasko C, Lovas S, Ruzsa M, Baka J, Kovacs B, Mikite K, Szemenyei V, Molnar G, Ozsvar A, Olah G, Piszar I, Zvara A, **Patocs A**, Barzo P, Puskas LG, Tamas G
Human neuronal changes in brain edema and increased intracranial pressure
ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS 4:(1) Paper 78. 11 p. (2016)
75. Fazakas Á, Szelényi Z, Szénási G, Nyirő G, Szabó PM, **Patócs A**, Tegze N, Fekete BC, Molvarec A, Nagy B, Jakus J, Örsi F, Karádi I, Vereckei A
Genetic predisposition in patients with hypertension and normal ejection fraction to oxidative stress

- JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION** 10:(2) pp. 124-132. (2016)
Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 2.656*
76. Juhasz E, Kiss E, Simonova E, **Patocs A**, Reismann P
Serum prolactin as a biomarker for the study of intracerebral dopamine effect in adult patients with phenylketonuria: a cross-sectional monocentric study.
EUROPEAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH 21:(1) Paper 22. 6 p. (2016) IF: 1.684*
77. Kacso G, Ravasz D, Doczi J, Nemeth B, Madgar O, Saada A, Ilin P, Miller C, Ostergaard E, Iordanov I, Adams D, Vargado Z, Araki M, Araki K, Nakahara M, Ito H, Gal A, Molnar MJ, Nagy Z, **Patocs A**, Adam-Vizi V, Chinopoulos C
Two transgenic mouse models for beta subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations
BIOCHEMICAL JOURNAL 473:(20) pp. 3463-3485. (2016)
Független idéző: 1 Független idéző: 1 Összesen: 2 IF: 3.562*
78. Marczell I, Hrabak A, Nyiro G, **Patocs A**, Stark J, Dinya E, Kukor Z, Toth S, Tulassay ZS, Racz K, Bekesi G
17-beta-estradiol Decreases Neutrophil Superoxide Production through Rac1
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 124:(10) pp. 588-592. (2016)
IF: 1.665*
79. Molnar A, Kovesdi A, Szucs N, Toth M, Igaz P, Racz K, **Patocs A**
Polymorphisms of the GR and HSD11B1 genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease.
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 85:(2) pp. 180-188. (2016)
Független idéző: 1 Összesen: 1 IF: 3.487*
80. Molnár Ágnes, Kövesdi Annamária, Sarkadi Balázs, Rác Károly, **Patócs Attila**
A krónikus glükokortikoidhormon-pótlás aktuális kérdése
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 69:(1) pp. 38-45. (2016)
81. Doleschall M, Luczay A, Koncz K, Hadzsiev K, Erhardt E, Szilagyi A, Doleschall Z, Nemeth K, Torok D, Prohaszka Z, Gereben B, Fekete G, Glaz E, Igaz P, Korbonits M, Toth M, Racz K, **Patocs A**
A unique haplotype of RCCX copy number variation: from the clinics of congenital adrenal hyperplasia to evolutionary genetics
EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 25:(6) pp. 702-710. (2017) IF: 4.580**
82. Karvaly G, Meszaros K, Kovacs K, **Patocs A**, Sipak Z, Vasarhelyi B
Looking beyond linear regression and Bland-Altman plots: a comparison of the clinical performance of 25-hydroxyvitamin D tests.
CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 55:(3) pp. 385-393. (2017) IF: 3.017**
83. Nagy Z, Szabó PM, Grolmusz VK, Perge P, Igaz I, **Patócs A**, Igaz P
MEN1 and microRNAs: The link between sporadic pituitary, parathyroid and adrenocortical tumors?
MEDICAL HYPOTHESES 99: pp. 40-44. (2017) IF: 1.136**
84. Zotter Z, Nagy Z, **Patocs A**, Csuka D, Veszeli N, Kohalmi KV, Farkas H
Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency.
ORPHANET JOURNAL OF RARE DISEASES 12:(1) Paper 5. 8 p. (2017) IF: 3.290**

VIII.6. Összefoglaló közlemények

85. Rác K, Tóth M, Jakab CS, **Patócs A**, Kiss R
Acromegaly: a feltűnő, mégis későn felismert betegség [Acromegaly: a disorder with distinguished features yet delayed diagnosis]
ORVOSI HETILAP 143:(19 Suppl) pp. 1052-1057. (2002)
Független idéző: 2 Összesen: 2
86. Majnik J, **Patocs A**, Balogh K, Luczay A, Torok D, Szabo V, Borgulya G, Gergics P, Szappanos A, Bertalan R, Belema B, Toke J, Sereg M, Nagy ZZ, Solyom J, Toth M, Glaz E, Racz K, Nemeth J, Fekete G, Tulassay Zs
A glükokortikoidreceptor gén szekvenciavariánsai és jelentőségük a glükokortikoidok iránti érzékenység meghatározásában [Nucleotide sequence variants of the glucocorticoid receptor gene and their significance in determining glucocorticoid sensitivity]
ORVOSI HETILAP 147:(44) pp. 2107-2115. (2006)
87. Szűcs N, Gláz E, Varga I, Tóth M, Kiss R, **Patócs A**, Jakab Cs, Perner F, Járay J, Horányi J, Dabasi G, Molnár F, Major L, Fütő L, Rác K, Tulassay Zs
A primer aldosteronismus diagnosztikája és a kezelés eredményei 187 beteg adatainak retrospektív elemzése alapján
ORVOSI HETILAP 147:(2) pp. 51-59. (2006)
Független idéző: 2 Összesen: 2
88. Halász Z, Bertalan R, Tőke J, Tömböl Zs, Losonczy L, **Patócs A**, Solyom J, Fekete Gy, Rác K

- A többszörös hypophysishormon-hiány genetikai okai: A hypophysis transzkripció faktorok szerepe
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 419-424. (2007)
89. Reismann P, Varga I, **Patócs A**, Gergics P, Tóth M, Szűcs N, Gláz E, Rác K, Tulassay ZS
 A hormonvizsgálatok fejlődésének 50 éve, nemzetközi visszatekintés és hazai tapasztalatok
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 403-411. (2007)
 90. Boyle B, **Patócs A**, Likó I, Bertalan R, Lendvai N, Szappanos Á, Butz H, Rác K, Balázs CS
 A glukokortikoid-receptor gén polimorfizmusok szerepe autoimmun betegségekben
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61:(3) pp. 171-175. (2008)
 91. Judit Toke, **Attila Patócs**, Katalin Balogh, Péter Gergics, Balázs Stenczer, Károly Rác, Miklós Tóth
 Parathyroid hormone-dependent hypercalcemia
WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE 121:(7-8) pp. 236-245. (2009)
 Független idéző: 9 Összesen: 9 IF: 0.955
 92. Reismann P, Liko I, Igaz P, **Patócs A**, Rác K
 Pharmacological Options for Treatment of Hyperandrogenic Disorders
MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY 9:(9) pp. 1113-1126. (2009)
 Független idéző: 6 Összesen: 6 IF: 2.971
 93. Tőke J, **Patócs A**, Gergics P, Bertalan R, Tóth M, Rác K, Tulassay Zs
 Az extracelluláris kalciumkoncentráció érzékelése egészséges és kóros állapotokban
ORVOSI HETILAP 150:(17) pp. 781-790. (2009)
 94. Ács Bence, Szappanos Ágnes, Likó István, Majnik Judit, Ács Orsolya, Boyle Belema, Tóth Miklós, Rác Károly, **Patócs Attila**
 Glükokortikoidok iránti rezisztencia: új molekuláris mechanizmusok, új klinikai ismeretek
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 64:(5) pp. 257-265. (2011)
 95. Halászlaki C, Takács I, Butz H, **Patócs A**, Lakatos P
 Novel genetic mutation in the background of Carney complex
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(2) pp. 149-152. (2012)
 Független idéző: 4 Összesen: 4 IF: 1.555
 96. Kender Z, Torzsa P, Grolmusz K V, **Patocs A**, Lichthammer A, Veresne Balint M, Racz K, Reismann P
 A metilglioxál metabolizmus szerepe 2-es típusú cukorbetegségben és szövődményeiben [The role of methylglyoxal metabolism in type-2 diabetes and its complications]
ORVOSI HETILAP 153:(15) pp. 574-585. (2012)
 Független idéző: 2 Összesen: 2
 97. Marczell I, Tulassay Zs, Békési G, Tóth M, **Patócs A**, Stark J, Rác K
 A sejtfelszíni szteroidreceptorok szerepe és azok klinikai vonatkozásai
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 65:(5) pp. 289-297. (2012)
 98. Offergeld C, Brase C, Yaremchuk S, Mader I, Rischke HC, Gläsker S, Schmid KW, Wiech T, Preuss SF, Suárez C, Kopeć T, **Patocs A**, Wohllk N, Malekpour M, Boedeker CC, Neumann HPH
 Head and neck paragangliomas: clinical and molecular genetic classification
CLINICS 67:(S1) pp. 19-28. (2012)
 Független idéző: 36 Független idéző: 2 Összesen: 38
 99. Feldman Karolina, Likó István, Nagy Zsolt, Szappanos Ágnes, Grolmusz Vince Kornél, Tóth Miklós, Rác Károly, **Patócs Attila**
 11-β-hidroxisteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben
ORVOSI HETILAP 154:(8) pp. 283-293. (2013)
 Független idéző: 2 Összesen: 2
 100. Nagy Zsolt, Rác Károly, Patócs Attila
 A perifériás cirkadián órák jelentősége az anyagcserezavarok kialakulásában
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(6) pp. 374-380. (2014)
 101. Tőke Judit, Czirják Gábor, Bezzegh Attila, Vásárhelyi Barna, Rác Károly, **Patócs Attila**
 Az ösztadiol hatásai és jelentősége férfiakban
ORVOSI HETILAP 155:(23) pp. 891-896. (2014)
 Független idéző: 1 Összesen: 1
 102. Bazso A, Szappanos A, **Patocs A**, Poor G, Shoenfeld Y, Kiss E
 The importance of glucocorticoid receptors in systemic lupus erythematosis. A systematic review.
AUTOIMMUNITY REVIEWS 14:(4) pp. 349-351. (2015)
 Független idéző: 8 Összesen: 8 IF: 8.490
 103. Herold Zoltán, Nagy Péter, **Patócs Attila**, Somogyi Anikó
 A kromogranin-A és a belőle lehasadó WE-14 szerepe az 1-es típusú cukorbetegség kialakulásában
ORVOSI HETILAP 156:(5) pp. 163-170. (2015)
 104. Igaz P, Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabo PM, Falus A, **Patócs A**, Rác K
 MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy.

- CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES** 72:(3) pp. 417-428. (2015)
 Független idéző: 8 Függő idéző: 1 Összesen: 9 IF: 5.694
105. Szappanos A, Nagy Z, Kovacs B, Poor G, Toth M, Racz K, Kiss E, **Patocs A**
 Tissue-Specific Glucocorticoid Signaling May Determine The Resistance Against Glucocorticoids In Autoimmune Diseases.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 22:(9) pp. 1126-1135. (2015)
 Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3 IF: 3.455
106. Vasarhelyi B, Meszaros K, Karvaly G, **Patocs A**
 Fókuszban a szöveti biomarkerek. Az ösztrogének mint a szövetspecifikus immunválasz és autoimmunitás modulálásának kulcsszereplői
ORVOSI HETILAP 156:(51) pp. 2070-2076. (2015)
107. Decmann A, Perge P, Nagy Z, Butz H, **Patócs A**, Igaz P
 Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában: Circulating microRNAs in the diagnostics of endocrine neoplasms
ORVOSI HETILAP 158:(13) pp. 483-490. (2017) IF: 0.291**

IX. Tudománymetria adatok

Összesített impakt faktor:	543.542
Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora:	134.004
Összes hivatkozások száma:	2321
Független hivatkozások száma:	1939
Hirsch index:	26
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora:	165.739
Ebből első és utolsó szerzős:	59.811
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények független hivatkozásainak száma:	621
Az értekezésben nem tárgyalt további közlemények impakt faktora:	377.803

Patócs Attila Balázs tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2017.06.12.)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikkek²	162	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	100	1466	1774
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	2	2
szakcikk, magyar nyelvű	---	18	2	4
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	4	164	216
összefoglaló közlemény	---	34	266	280
rövid közlemény	---	5	26	29
II. Könyv	2	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	1	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	6	---	---	---
idegen nyelvű	---	3	0	0
magyar nyelvű	---	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	2	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	1	---	6	6
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	3	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	168	1932	2311
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	171	---	1932	2311
V. További tudományos művek	7	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	3	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	6	9
VI. Idézett absztraktok⁵	1	---	1	1
Idézettség száma¹	---	---	1939	2321
Hirsch index⁶	26	---	---	---
g index⁶	45	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	14	309
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	33	258
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2005 -) teljes tudományos folyóiratcikkek	138	1935
Az utolsó 10 év (2007-2017) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	129	1739
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	207	8,92%
Idézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS/Scopus rendszerben	128	
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	2	103

*Az MTMT nem tudja szolgáltatni a megosztott első és megosztott utolsó szerzőség adatokat. Ezeket a kérelmezőnek a doktori eljárás folyamán a 3. sz. adatlapon kell feltüntetnie.

Megjegyzések:

¹ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli - WOS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

⁵ nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

⁶ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva

⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények idézettsége külön értékelendő, és nem számítható be az összesített idézetek közé

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos munka iránti lelkesedésem elsősorban **Rácz Károly Professzor Úrnak** köszönhető. Neki köszönhető, hogy végzős hallgatóként befogadott a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Endokrin Munkacsoportjába, ahol PhD munkám vezetőjeként, majd a Klinika igazgatójaként kutatómunkámban mindvégig támogatott. Neki köszönhető az is, hogy PhD munkám befejezése után külföldi posztdoktor kutatómunkát is végezhettem az Amerika-i Egyesült Államokban. Rácz professzor Úr mindvégig támogatott és lehetőséget biztosított, hogy az Endokrinológiai Genetika Laborban önálló kutatócsoportot hozhassak létre. Köszönettel tartozom, **prof. Tóth Miklósnak**, aki mint TDK munkavezetőm bevezetett a kitartó és a minden apró részletre kiterjedő adatgyűjtés és a klinikai adatok értékelésének mechanizmusára. **Dr. Tulassay Zsolt Professzor Úrnak**, az MTA rendes tagjának, a II. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának és az MTA-SE Molekuláris Medicina Kutatócsoport volt vezetőjének szintén hálával tartozom, hiszem a nyugodt kutatómunka lehetőségét jelentet ebben a csoportban dolgozni.

Köszönettel tartozom **Charis Eng Professzor Asszonynak** a Cleveland Clinic Genomic Medicine Intézet igazgatójának, aki posztdoktor munkámat vezette, és olyan feltételeket teremtett laboratóriumában, ami kivételes lehetőséget jelentett önálló témavezetővé és önálló kutatóvá válásomban, és a kritikus, tudományos gondolkodás elsajátításában alapvető szerepet játszott. Hazatérésem után is számos közös tudományos munkát végeztünk, amelyek eredményei magas impak faktorú lapokban kerültek elfogadásra.

A Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai munkacsoportjából számos további kollégának tartozom hálával, de külön kiemelném volt PhD társaimat: dr. Balogh Katalint, dr. Majnik Juditot, dr. Gergics Pétert, dr. Szappanos Ágneszt, dr. Tőke Juditot és dr. Boyle Belemát, akikkel közösen számos érdekes módszertani fejlesztést végeztünk. Dr. Szabó Péternek és dr. Tömböl Zsófiának is köszönettel tartozom, a kedves, nagyon baráti és inspiráló légkör kialakításáért. **Gláz Edit Professzor Asszonynak** is hálával tartozom, hogy bemutatta, hogy a mindennapi laboratóriumi munka mennyire is nélkülözhetetlen a klinikai endokrinológiában. **Dr. Igaz Péter egyetemi docens Úrnak**, **dr. Likó István és dr. Doleschall Márton tudományos munkatársaknak** is szeretném kifejezni köszönetemet, hiszen tudományos munkám kezdetétől számos közös munkában vettünk részt és számos nehéz feladatot oldottunk meg együtt sikeresen.

A számos külföldi kapcsolataim közül hálával tartozom **Hartmut Neumann** professzornak Freiburgból, akivel az elmúlt tíz évben számos közös, nagy multicentrikus tanulmányt végeztünk, és a hazai von Hippel-Lindau Társaság elindításában is elévülhetelen szerepet játszott. Szintén hálás vagyok **Korbonits Márta professzor Asszonynak**, akivel a hipofízis daganatok területén dolgoztunk együtt.

Természetesen ez a tudományos munka nem készülhetett volna el a nagyon lelkes és ügyes PhD hallgatóim nélkül. Végzett PhD hallgatóim közül köszönetet mondok **Dr. Butz Henriettnek**, **dr. Feldman-Kovács Karolinának**, **dr. Igaz Ivánnak**, **dr. Grolmusz Vince Kornélnak**, **dr. Lendvai Nikolettnek** és a jelenleg a fokozatszerzési eljárás végén járó hallgatóimnak **dr. Nagy Zsoltnak**, és **dr. Molnár Ágnesnek**. Jelenleg három hallgató dolgozik vezetésem alatt: dr. Sarkadi Balázs, dr. Kövesdi Annamária és Reinig Márta, akinek szintén szeretném kifejezni köszönetemet, hiszen mint TDK hallgatók már eddig is fontos feladatokat végeztek el és több díjat nyertek közös munkáinkkal. Az asszisztensek közül hálával tartozom Krauszné Vaczula Máriának, és az izotóp laboratórium volt és jelenlegi munkatársainak. Szintén köszönöm a segítséget a HPLC és tömegspektrométeren dolgozó Mészáros Katalian és Karvaly Gellért kollégáknak, valamint a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának **Vásárhelyi Barna professzor Úrnak** is hálás vagyok a kitartó támogatásáért.

Az eredményes kutatómunka egyik feltétele a kutatásokhoz rendelkezésre álló források. Szeretném kifejezni köszönetemet az OTKA irodának, az ETT-nek és az NKFIH-nak a támogatásokért, valamint hálás vagyok az MTA-nak, hogy 2013-tól önálló Lendület kutatócsoportot vezethettem. Az MTA TKI iroda minden munkatársának, de különös tekintettel **Berzéné Péntes Ilonának** és **Idei Miklós igazgató Úrnak** köszönöm a felém irányuló bizalmukat és támogatásukat.

Végül családomnak: szüleimnek, feleségemnek, nagymamámnak és testvéremnek tartozok hálával, akik a munkám végzéséhez szükséges nyugodt családi háttér mellett mindig biztosítottak támogatásukról.