

dc_206_11
MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Endokrin daganatok és immun-
neuroendokrin kölcsönhatások
molekuláris, bioinformatikai és klinikai
vizsgálata**

Dr. Igaz Péter PhD

Budapest

2011

	Rövidítések jegyzéke	3. old.
1.	BEVEZETÉS	4. old.
1.1.	Endokrin daganatok	4. old.
1.2.	Immun-neuroendokrin kölcsönhatások	6. old.
1.3.	Módszertani jelentőség	7. old.
2.	CÉLKITŰZÉSEK	10. old.
3.	BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12. old.
3.1.	Betegek és szövetminták	12. old.
3.2.	Sejtvonalak és <i>in vitro</i> kezelések	12. old.
3.3.	Molekuláris genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok	13. old.
3.3.1.	A mikroRNS expresszió vizsgálata	13. old.
3.3.2.	Génexpressziós (mRNS) vizsgálatok	13. old.
3.3.3.	DNS-szekvenálás és mutációanalízis	14. old.
3.3.4.	Komparatív genom hibridizáció (CGH)	14. old.
3.4.	Fehérjeexpressziós vizsgálatok és a hisztamin-tartalom mérése	14. old.
3.5.	Bioinformatikai vizsgálatok	15. old.
3.5.1.	A mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosítása (szövetspecifikus target predikciós módszer kidolgozása)	15. old.
3.5.2.	Mellékvesekéreg- daganatok funkcionális genomikai metaanalízise	15. old.
3.5.3.	Útvonalelemzés	16. old.
3.5.4.	<i>In silico</i> genomikai vizsgálatok	16. old.
3.5.5.	Statisztikai módszerek	16. old.
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	17. old.
4.1.	Mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata	17. old.
4.2.	Új módszer kifejlesztése a mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosítására (szövetspecifikus target predikció) és útvonalelemzés mellékvesekéreg-daganatokban	18. old.
4.3.	Phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata	19. old.
4.4.	Funkcionális genomikai metaanalízis mellékvesekéreg-daganatokban	20. old.
4.5.	A hisztamin szerepe mellékvesekéreg-	21. old.

	daganatokban	206_11
4.6.	In silico genomikai vizsgálatok	23. old.
4.7.	Citokinek és receptoraik vizsgálata hypothalamikus GnRH-neuronokban: az oncostatin M (OSM) jelentősége	24. old.
4.8.	MEN2A-szindrómában szenvedő betegek vizsgálata	25. old.
5.	ÖSSZEFOGLALÁS, VIZSGÁLATAIM FŐ MEGÁLLAPÍTÁSAI	26. old.
5.1	Eredményeim potenciális klinikai-gyakorlati hasznosítási lehetőségei	31. old.
6.	Az értekezést megalapozó közlemények listája	32. old.
6.1.	Idegen nyelvű folyóiratcikkek ΣIF: 40,04	32. old.
6.2.	Magyar nyelvű folyóiratcikkek	35. old.
6.3.	Az értekezéshez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások	36. old.
6.4.	Az értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek	36. old.
7.	Az értekezésben nem szereplő folyóiratcikkek listája	39. old.
8.	A főbb scientometriai adatok összefoglalása	49. old.
9.	Köszönetnyilvánítás	50. old.

Rövidítések jegyzéke: dc_206_11

ACC: mellékvesekéreg-carcinoma
CGH: komparatív genom hibridizáció
CT: cycle threshold (cikluszám küszöb polimeráz láncreakcióban)
dCT: delta CT – a cikluszámok különbsége
DAO: diamin-oxidáz
GnRH: gonadotropin releasing hormon
GR: glükokortikoidreceptor
GSEA: géncsoport dúsulás vizsgálata/Gene Set Enrichment Analysis
HDC: hisztidin-dekarboxiláz
HNMT: hisztamin N-metil-transzferáz
HRH: hisztaminreceptor
IGF-2: inzulinszerű növekedési faktor 2
IL: interleukin
LEA: leading edge analysis/vezetőél elemzés
MAPK: mitogén aktiválta protein kináz
MEN: multiplex endokrin neoplasia
miR: mikroRNS
mRNS: hírvivő (messenger) RNS
NF1: neurofibromatosis 1-es típusa
NMDA: N-metil-D-aszpartát
qRT-PCR: kvantitatív reverz transzkripció – polimeráz láncreakció
OSM: oncostatin M
PCR: polimeráz láncreakció
ROC: receiver-operator characteristics/hatásfokmérő karakterisztika
TLDA: Taqman Low Density Array
TOP2A: topoizomeráz 2A
VHL: von Hippel-Lindau
XPO1: exportin

1.1. Endokrin daganatok

A daganatok patogenezise rendkívül összetett folyamat, amelyben számos endogén és környezeti tényező játszik szerepet. Érdeklődésem középpontjában az **endokrin szervek daganatainak** kutatása áll, azokon belül is elsősorban a **mellékvese daganatai** képezik kutatásaim fő tárgyát.

A mellékvese daganatai gyakoriak és gyakoriságuk az életkorral emelkedik, 50 éves életkor felett akár a népesség 5-7 %-ában is előfordulhatnak. Jelentős részüket más betegség gyanúja miatt végzett képalkotó vizsgálatok során véletlenül fedezik fel, ezeket **incidentalomáknak** hívjuk. A mellékvese-daganatok döntő többsége jóindulatú, hormonálisan inaktív mellékvesekéreg-adenoma. A hormontermelő mellékvesekéreg eredetű daganatok súlyos klinikai következményekkel (glükokortikoid túltermelés - Cushing szindróma, mineralokortikoidok túltermelés - primer aldosteronizmus) társulnak. A **mellékvesekéreg-carcinoma (ACC) ritka, rossz prognózisú daganat.** A mellékvese daganatainak 5-8 %-a **phaeochromocytoma**, amely catecholamintermelése következtében **életveszélyes szövődményekkel** (stroke, myocardialis infarctus) **társulhat.** A kromaffin sejtekből kiinduló phaeochromocytomák döntő többsége (kb 80%) a mellékvesevelőben alakul ki, míg 20 %-uk mellékvesén kívüli (extraadrenális) elhelyezkedésű. Az extraadrenális phaeochromocytomákat más néven paragangliomáknak nevezzük.

Az utóbbi évek vizsgálatai során számos tényezőre derült fény mind a mellékvesekéreg, mind a mellékvesevelő daganatok kialakulásának folyamataiban, azonban továbbra is távol állunk egy átfogó képtől. Az öröklődő, mellékvese-daganatokra hajlamosító daganatszindrómák tanulmányozása során több fontos, a sporadikus daganatokban is szereplő patogenetikai mechanizmust azonosítottak, azonban a mellékvese-daganatok döntő többségét kitevő sporadikus daganatok patogenezise csak kevésé ismert.

~~ok 206 11~~
Az MTA doktori értekezésén alapját képező munkák hangsúlyos részét képezik a mellékvese-daganatok mikroRNS expresszió mintázatának vizsgálatai. A génexpresszió poszttranszkripciós szabályozásának alapvető mechanizmusát képező RNS-interferencia endogén mediátorainak, a mikroRNS-ek kutatása a korszerű molekuláris biológiai vizsgálatok egyik legfontosabb irányát képviseli. A külön gének által kódolt, érett formájukban 20-24 nukleotid hosszúságú mikroRNS-ek nagyon specifikusan képesek kötődni a hírvivő RNS-ek (mRNS) 3' nem kódoló végéhez és kötődésük nyomán azok fehérjévé íródását (transzláció) gátolják vagy lebontásukat eredményezik. A mikroRNS-ek expressziós mintázata számos betegségben, így daganatokban is megváltozik. A mikroRNS mintázat eltérései a génexpressziós (mRNS) mintázatok vizsgálatához hasonlóan alkalmasak lehetnek a patogenezis tanulmányozására, daganatok osztályozására, a jó- és rosszindulatúságot jelző valamint és prognosztikus markerek azonosítására.

A mikroRNS-ek mellett a hírvivő RNS-ek (mRNS) expressziós mintázatait is tanulmányoztuk és fehérjeszintű vizsgálatokat is végeztünk.

Munkáim során új génexpressziós (mRNS), mikroRNS és fehérjeszintű eltéréseket derítettünk fel korszerű molekuláris és bioinformatikai módszerek felhasználásával. A mellékvesekéreg daganatainak mikroRNS expressziós mintázata terén elsőként, a phaeochromocytomák körében a világon az elsők között végeztünk vizsgálatokat. Mellékvesekéreg-daganatokban a világon elsőként végeztünk bioinformatikai metaanalízist.

Míg a mellékvesekéreg-daganatok elenyésző része öröklődő, addig a mellékvesevelőből kiinduló phaeochromocytomák genetikája a sporadikus daganatok között kivételes, mivel a **sporadikusan felismert phaeochromocytomák 25-30 %-a csírasejtes mutációk talaján alakul ki** és öröklődő daganatszindróma képében jelentkezik (multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa (MEN2), von Hippel-Lindau szindróma (VHL), neurofibromatosis 1-es típusa (NF1), öröklődő paraganglioma szindrómák). Bár e daganatszindrómák klinikai képe jellegzetes, **egyedek klinikai fenotípussal társulnak, amelyek háttérében meghatározott mutációk állnak.**

Mind a mellékvesekéreg-daganatok, mind a phaeochromocytomák esetében komoly probléma, hogy a **rosszindulatúság megállapítása szövettani vizsgálat alapján nehéz**, sőt a phaeochromocytomák esetében nem is lehetséges. A phaeochromocytomák rosszindulatúságát kizárólag klinikai kritériumok, áttétek jelenlétében állíthatjuk fel. Áttétek azonban évekkkel, akár évtizedekkel a primer daganat eltávolítása után is jelentkezhetnek. Bár intenzív kutatások folynak e téren, jelenleg nem ismert olyan szövettani, ill. molekuláris marker, ami alapján az eltávolított phaeochromocytoma dignitása megállapítható lenne. A rosszindulatú phaeochromocytomák gyógyszeres kezelése sem megoldott. Szintén **nem ismert olyan marker, ami e daganatok recidíva hajlamát jelezné**. Különösen nagy gyakorlati jelentősége lehet olyan molekuláris markerek azonosításának, amelyek segítségével a mellékvesekéreg és mellékvesevelő-daganatok rosszindulatú viselkedése biztonsággal jelezhető.

A sebészi kezeléstől eltekintve a mellékvese-daganatok kezelésében **konzervatív kezelési lehetőségeink igen korlátozottak**, ami a molekuláris patogenezis kutatásának fontosságát és új gyógyszeres támadáspontok felderítésének szükségességét jelzi. Mind a mellékvesekéreg-carcinoma, mind a malignus phaeochromocytoma gyógyszeres kezelése terén nagy igény lenne új, biztonságos és hatékony gyógyszerek kifejlesztésére. A patogenezis vizsgálata olyan utakat tárhat fel, amelyek potenciális gyógyszeres támadáspontokat is jelenthetnek.

1.2. Immun-neuroendokrin kölcsönhatások

Munkám másik fő irányát az immun és neuroendokrin rendszerek kölcsönhatásainak kutatása képezi. E két alapvető homeosztatisz rendszer számos szinten kapcsolódik egymáshoz. E kapcsolatok hátterében részben a két rendszer medátorainak és ezek receptorainak kölcsönös kifejeződése áll. A neuroendokrin rendszer mediátorai, a hormonok ugyanis az immunrendszerben is termelődnek és az immunsejtek hormonreceptorokat is hordoznak, ill. az immunrendszer parakrin mediátorai, a citokinek a neuroendokrin sejtekre is hatnak, sőt a neuroendokrin rendszerben is termelődnek. E kölcsönhatásrendszer egyik legjobban ismert példája a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg

de_2006_11

(HPA) rendszer, ahol a gyulladásos citokinek (tumor nekrosis faktor (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6) hatására a rendszer aktiválódik és a mellékvesekéreg glükokortikoid termelése megindul. A citokinek számos endokrin folyamatot befolyásolnak, így a reproduktív szabályozás több szintjét is, de e rendszer karmestereinek, a **hypothalamikus GnRH-t (gonadotrop hormon releasing hormon) termelő neuronjainak kapcsolata a citokinrendszerrel vizsgálataimat megelőzően nem volt ismert.**

Az immunológiai és gyulladásos folyamatok a daganatok kialakulásában is fontos szerepet játszanak. **Az endokrin daganatok és az immunfolyamatok kapcsolata az immun-neuroendokrin kölcsönhatások érdekes kérdése, ami munkám két fő irányának kapcsolódását jelzi.** A hisztamin, amely a gyulladásos folyamatok egyik fő mediátora több daganat (pl. melanoma malignum, emlőrák, vastagbélrák) patogenezisében szerepet játszik, azonban a **mellékvesekéreg daganataiban betöltött jelentőségére vizsgálataink szolgáltatattak először adatokat.** A mellékvesekéreg-daganatok bioinformatikai metaanalízise során is kimutattuk az immunológiai folyamatok jelentőségét.

1.3. Módszertani jelentőség

Az utóbbi évtized legjelentősebb metodikai előrelépései közé tartozik a nagy áteresztőképességű, bioinformatikai vizsgálatok kifejlesztése. E vizsgálatok révén lehetségessé vált a **teljes genom génexpressziós vizsgálata, megállapítható, hogy mely gének fejeződnek ki és melyek nem egy adott szövetben (transzkriptomika, funkcionális genomika).** A génexpressziós vizsgálatok metodikai háttérét a microarray (chip) metodika képezi. Lehetséges a kromoszómaeltérések bioinformatikai vizsgálata (komparatív genom hibridizáció (CGH)) is számos más alkalmazási lehetőség mellett.

A génexpressziós microarray vizsgálatok egyik leghatékonyabb alkalmazási területe a daganatok kutatása. Adott szerv jó- és rosszindulatú daganatainak, rosszindulatú daganatok különböző stádiumainak összehasonlításával azonosíthatók a patogenetikai mechanizmusok, a

de.2006.11

daganatok elkülönítését lehetővé tevő molekuláris markerek, lehetséges a daganatok bioinformatikai alapú osztályozása, prognosztikus markerek felállítása. A génexpressziós vizsgálatok értékelésében komoly probléma, hogy a különböző munkacsoportok által adott daganattípuson végzett vizsgálatok eredményei között sokszor jelentősek a különbségek. Ennek háttérben a mintaválasztás különbségei, a microarray platformok, statisztikai módszerek eltérései szerepet játszanak. E probléma egyik megoldását a bioinformatikai vizsgálatok metaanalízise jelentheti, amelynek segítségével a különböző eredmények együttesen értelmezhetőek, közös patogenetikai utak azonosítása válhat lehetségessé. **Mellékvesekéreg-daganatokban a világon elsőként végeztünk bioinformatikai metaanalízist.**

***In silico* genomikai vizsgálatok** révén vizsgálhatók az eddig közölt génszekvenciák is **genetikai variánsok**, szekvenciapolimorfizmusok azonosítása céljából. A genetikai variánsokat számos betegségekre vonatkozó hajlammal hozták már kapcsolatba. *In silico* genomikai vizsgálataim során az endokrin daganatokra hajlamosító multiplex endokrin neoplasia gének, a szteroidhormonok bioszintézisében és lebomlásában szereplő enzimek génjei, a glükokortikoid hormonok hatását meghatározó glükokortikoidreceptor gén valamint a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szereplő gének szekvenciavariánsainak azonosítására tettünk kísérletet. Elképzelhető, hogy e variánsok az endokrin daganatok kialakulását ill. immun-neuroendokrin kölcsönhatásokat is befolyásolhatják, azonban *in silico* azonosított variánsokról lévén szó, ezek igazolásához populációgenetikai, illetve kísérletes vizsgálatok szükségesek.

A **mikroRNS-ek** biológiai hatásának felderítésében a legnagyobb problémát a **cél mRNS-ek azonosítása** jelenti. A mikroRNS mintázat eltéréseiből ugyanis nem tudunk közvetlenül következtetni a háttérben álló patomechanizmusokra, ehhez a célgének ismerete szükséges. A mikroRNS-ek potenciális célgénjeinek azonosításához a kutatócsoportok *in silico* predikciós algoritmusokat használnak (**target predikció**). Ezek azonban olyan nagy mennyiségű potenciális cél mRNS-t adnak ki, amelyek közül a biológiaiilag releváns mRNS-ek kiválasztása igen nehéz. E probléma

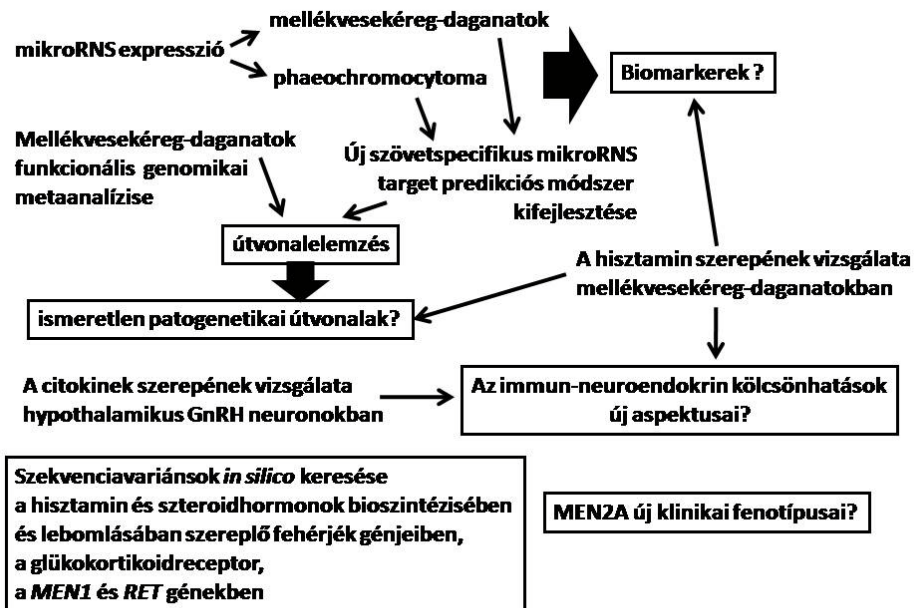
megoldásként egy új, **paralelizált miRNS expresszió meghatározáson alapuló, szövetspecifikus predikciós módszert** dolgoztunk ki.

2. CÉLKITŰZÉSEK dc_206_11

1. A mikroRNS expressziós mintázat vizsgálata a mellékvesekéreg daganataiban, a jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítését lehetővé tévő mikroRNS markerek azonosítása céljából.
2. A mikroRNS-ek potenciális cél mRNS-einek azonosítására használható új bioinformatikai módszer kidolgozása párhuzamos teljes genom expressziós vizsgálat felhasználásával.
3. A phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata, a daganatok recidíváját jelző mikroRNS marker azonosítása.
4. A paraffinos szövetblokkok alkalmazási lehetőségének vizsgálata a phaeochromocytomák mikroRNS expressziójának tanulmányozására.
5. Útvonalelemzés végzése a mikroRNS-ek potenciális cél mRNS-einek felhasználásával a mellékvese daganataiban.
6. Funkcionális genomikai metaanalízis végzése a szakirodalomban eddig közölt génexpressziós és komparatív genom hibridizáció (CGH) eredmények felhasználásával mellékvesekéreg-daganatokban. Útvonalelemzés a közös patogenetikai utak feltárására.
7. Párhuzamos génexpressziós és CGH vizsgálat végzése ugyanazon mellékvesekéreg-daganat mintákon a génexpressziós vizsgálatok háttérében álló kromoszomális eltérések felderítése céljából.
8. A hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szereplő gének és fehérjék kifejeződésének, valamint a hisztamin koncentrációjának vizsgálata mellékvesekéreg-daganatokban.
9. *In silico* genomikai vizsgálatok révén új szekvenciavariánsok azonosítása a a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szereplő szereplő fehérjék, a multiplex endokrin neoplasia szindrómák, a glükokortikoidreceptor, a szteroidhormonok bioszintézisében és lebontásában résztvevő fehérjék génjeiben.
10. Hypotalamikus GnRH-neuronok citokin és citokinreceptor expressziós mintázatának tanulmányozása. Az oncostatin M (OSM) citokin hatásának vizsgálata korai gének és a GnRH expressziójára.

11. A pheochromocytoma és paraganglioma (PPGL) hajlamosító öröklődő daganatszindrómák közül a multiplex endokrin neoplasia 2-es típus (MEN2) háttérben álló mutációk vizsgálata. A MEN2-re hajlamosító *RET* protoonkogén két mutációjával társuló egyedi klinikai fenotípusok jellemzése.

A célkitűzések összefoglalása:



3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek és szövetminták

A mellékvesekéreg szövetminták (n=58) közül 15 ép mellékvesekéreg szövetből, 18 hormonálisan inaktív, 8 kortizoltermelő, 9 aldosterontermelő adenomából és 8 kortizoltermelő mellékvesekéreg carcinomából (ACC) származott. Egészséges mellékvesekéreg szöveteket rosszindulatú vesedaganat miatt történt műtét során eltávolított ép mellékvesékből nyertünk.

A pheochromocytomák között (n=33) 9 sporadikus benignus, 8 MEN2, 6 VHL, 5 NF1, 5 recidiváló daganatot vizsgáltunk. A mikroRNS expresszió vizsgálatához paraffinos szövetblokkokat használtunk.

A MEN2-re hajlamosító RET protoonkogén Cys609Ser ill. Cys611Tyr mutációt hordozó egy-egy család több tagját vizsgáltuk.

Valamennyi humán mintákon végzett vizsgálathoz érvényes engedéllyel rendelkezünk az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságától és minden résztvevő betegtől írásos beleegyezést kértünk.

3.2. Sejtvonalak és in vitro kezelések

A hypothalamikus GnRH-neuronok citokin és citokinreceptor expresszióját és a citokinek hatásait GnV-4 patkány hypothalamus sejtvonalon és primer foetalis patkány hypothalamus tenyészeteken tanulmányoztuk. A GnV-4 sejtvonalat 12 h-s széruméheztetést követően oncostatin M (OSM), interleukin-6 (IL-6) és NMDA (N-metil -D-aszpartát) kezelésnek vetettük alá több kezelési időben.

3.3. Molekuláris genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok

3.3.1. A mikroRNS expresszió vizsgálata

A mikroRNS vizsgálatokhoz teljes RNS-t izoláltunk: fagyasztott mellékvesekéreg szövetekből Trizol reagensen alapuló módszerrel, a paraffinos szövetblokkokból Ambion RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit segítségével. A mikroRNS profil vizsgálata a mellékvesekéreg szövetmintákon Taqman TLDA kártyák, phaeochromocytomák esetében Agilent microarray vizsgálattal történt. A formalin-fixált paraffinos phaeochromocytoma minták alkalmazhatóságát három minta esetében fagyasztott és paraffinos mintapárok microarray-n alapuló korrelációvizsgálata alapján erősítettük meg. A mintaszámok növelését és az észlelt expressziós eltérések validálását mellékvese szövetmintákon Taqman valós idejű (real-time) kvantitatív RT (reverz-transzkripció)-PCR-rel (qRT-PCR) végeztük.

3.3.2. Génexpressziós (mRNS) vizsgálatok

Az mRNS expresszió vizsgálatához is teljes RNS-t izoláltunk. A hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebomlásában szereplő gének expressziójának vizsgálata mellékvesekéreg szövetmintákban Taqman qRT-PCR-rel történt.

Teljes genom génexpressziós microarray vizsgálatot 16 mellékvesekéreg mintán végeztünk (4 ép mellékvesekéreg, 4 hormonálisan inaktív adenoma, 4 kortizoltermelő adenoma, 4 ACC) Agilent microarray platformon.

A GnV-4 sejtvonalon a citokin és receptor mRNS-ek jelenlétét specifikus primerek felhasználásával kvalitatív RT-PCR-rel mutattuk ki. Az OSM hatására bekövetkező korai gén indukció (*c-fos*, *Egr-1*, *GADD45g*) vizsgálata szemikvantatív RT-PCR-rel történt (referenciagén: *S12*). A GnV-4 és a primer foetalis hypothalamikus kultúrák GnRH expressziójának vizsgálata qRT-PCR-rel történt.

3.3.3. DNS-szekvenálás és mutációanalízis

A phaeochromocytomára hajlamosító öröklődő daganatszindrómák mutációanalíziséhez genomikus DNS izolálása perifériás vérből történt (Roche). A mutációk analízise specifikus primerekkel végzett PCR során amplifikált DNS-szakaszok direkt szekvenálásával történt. A *VHL* gén mindhárom exonját rutinszerűen vizsgáltuk, a MEN2-ért felelős *RET* protoonkogén esetében a mutációk döntő többségét hordozó 10-es, 11-es, 13-as és 14-es exonok, MEN2B esetén a 15-ös és 16-os exonok rutinszerű szekvenálása történt.

3.3.4. Komparatív genom hibridizáció (CGH)

4 ACC, 4 hormonálisan inaktív és 3 kortizoltermelő mellékvesekéreg adenoma CGH vizsgálatát végeztük Agilent platformon genomikus DNS felhasználásával.

3.4. Fehérjeexpressziós vizsgálatok és a hisztamintartalom mérése

A hisztaminnal kapcsolatos fehérjék kifejeződését mellékvesekéreg-daganatokban, mind Western-blottal, mind immunhisztokémiával vizsgáltuk. A GnV-4 sejtvonalon a MAPK jelátviteli út aktiválódását a foszforilált és teljes Erk1/2-re specifikus ellenanyagok segítségével Western-blottal mutattuk ki.

A mellékvesekéreg szövetek hisztamin tartalmát ELISA módszerrel vizsgáltuk.

3.5. Bioinformatikai vizsgálatok 11

3.5.1. *A mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosítása (szövetspecifikus target predikciós módszer kidolgozása)*

A mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosításához interneten elérhető programokat használtunk: TargetScan, PicTar és miRBase Targets (későbbi nevén MicroCosm Targets). A potenciális cél mRNS-ek összesítéséhez egy saját fejlesztésű programot használtunk. Az internetes módszerek minden egyes mikroRNS-hez több ezer potenciális cél mRNS-t társítanak, amelyek közül csak kevés a biológiailag releváns. Egy új, párhuzamos mRNS expresszió vizsgálaton alapuló kétlépcsős szövetspecifikus módszert dolgoztunk ki ezek kiválasztására. Első lépésben az mRNS microarray alapján kiszűrhetjük azon mRNS-eket, amelyek nem expresszálódnak az adott szövetben, így nem állhatnak mikroRNS szabályozás alatt. Második lépésben azt a megfigyelést használtuk fel, hogy a mikroRNS-ek döntően az mRNS-ek lebomlását eredményezik, a mikroRNS-ekkel ellentétes irányú expressziós változásokat mutató mRNS-ek kiválasztásával, a szóbajövő mRNS-ek mennyisége számottevően csökkenthető. Ehhez a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, Géncsoport Dúsulás Vizsgálata) módszerét használtuk, ami egy géncsoport viszonylagos felül- vagy alulreprezentáltságát vizsgálja.

3.5.2. *Mellékvesekéreg-daganatok funkcionális genomikai metaanalízise*

Négy tanulmány teljes körűen elérhető teljes genom génexpressziós eredményeit elemeztük és osztályoztuk újra: ezek között 97 benignus, 67 malignus daganat és 18 ép mellékvesekéreg szövet volt elérhető. Mindemellett azon tanulmányok szignifikáns génlistáit és CGH eredményeit is elemeztük, ahol a nyers genomikai eredmények nem voltak elérhetők (269 jóindulatú, 215 rosszindulatú mellékvesekéreg-daganat és 30 ép mellékvesekéreg). A géncsoportokon belül GSEA módszerrel azonosítottuk a felül- vagy alulexpresszált géneket. A kromoszómaeltérések és a génexpressziós változások korrelálásához vezetőél elemzést (Leading Edge Analysis, LEA) végeztünk.

3.5.3. Útvonalelemzés dc_206_11

A mikroRNS predikciós algoritmusok során azonosított és módszerünkkel szűkített mRNS halmazokat és a metaanalízis eredményeit útvonal elemzésnek vetettük alá (Ingenuity Pathway Analysis (IPA)). Az IPA a génexpressziós eredményeket az adatbázisára vetítve jelöli ki az érintett patogenetikai utakat és hálózatokat.

3.5.4. *In silico* genomikai vizsgálatok

A hisztamin és a szteroidhormonok bioszintézisében, hatásában és metabolizmusában szerepet játszó fehérjék, a multiplex endokrin neoplasia 1-es és 2-es típusáért felelős gének szekvenciavariánsait a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program segítségével kerestük. A glükokortikoidreceptorban azonosított szekvencia variánsok potenciális funkcionális következményeit háromdimenziós molekuláris modellezéssel vizsgáltuk.

3.5.5. Statisztikai módszerek

Vizsgálataink többségében varianciaanalízist alkalmaztunk (ANOVA), majd post hoc tesztként a Tukey-, Scheffé- és Fisher-féle vizsgálatok történtek. A microarray vizsgálatok statisztikai vizsgálatában a GeneSpring és Statistica programokat használtuk. A hamisan pozitív eredmények minimalizálására Benjamini-Hochberg korrekciót alkalmaztunk. A korreláció vizsgálatához Spearman és Kendall módszereket használtunk. A biomarkerek vizsgálatához hatásfokmérő karakterisztikát (ROC-analízis, receiver-operator characteristics) alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVÉSELÉS

4.1. *Mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata*

A mellékvesekéreg-daganatokban 22 szignifikánsan változó mikroRNS-t találtunk 16 minta TLDA analízisével. Ezek közül 14 mikroRNS validálását végeztük el valós idejű qRT-PCR-rel, és a vizsgálati minták számát is megnöveltük ennek során (n=36): 10 ép szövet, 10 hormonálisan inaktív és 9 kortizoltermelő adenoma, valamint 7 kortizoltermelő ACC. A 14 mikroRNS közül hat validálása sikerült (*hsa-hsa-miR-184*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-503* és *hsa-miR-511*).

A *hsa-miR-184* és *hsa-miR-503* expressziója szignifikánsan magasabb volt a malignus daganatokban az ép szövethez és adenomákhoz, a *hsa-miR-210* kifejeződése ACC-kben szignifikánsan magasabb volt a kortizoltermelő adenomákhoz képest. A *hsa-miR-214* és *hsa-miR-511* kifejeződése szignifikánsan csökkent volt a többi csoporthoz képest az ACC mintákban. A *hsa-miR-375* expressziója az ép szövetekben szignifikánsan magasabb volt a kortizoltermelő adenomákhoz és az ACC-khez viszonyítva. Az onkogén-tumorsuppresszor dichotomia fogalmát a mikroRNS-ekre is kiterjesztve, a ***hsa-miR-184*, *hsa-miR-503* és *hsa-miR-210* onkogén, a *hsa-miR-214*, *hsa-miR-511* és *hsa-miR-375* tumorsuppresszor mikroRNS-nek tartható.** E mikroRNS-ekről számos adat ismert más daganatokban. Egyes daganatokban megfigyeléseinkhez hasonló irányban változtak, míg másokban ellentétes irányban, ami a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatását jelzi, vagyis ugyanazon mikroRNS egyes szövetekben onkogén, míg másokban tumorsuppresszor hatású lehet.

A mikroRNS-ek több daganat osztályozásában és rosszindulatú viselkedésének megállapításában hasznosnak bizonyultak. Egyes esetekben mikroRNS markerek segítségével olyan daganatok jó- és rosszindulatú formái is elkülöníthetők, amelyek esetében a szövettani vizsgálat nehézségekbe ütközik. A *hsa-miR-511* és *hsa-miR-503* expressziós különbsége bizonyult a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok elkülönítésére: a $dCT_{hsa-miR-511} - dCT_{hsa-miR-503}$ **különbsége 1,4 felett 100% érzékenységgel és 97% fajlagossággal jelzi a malignitást.** Ez az

eredmény gyakorlati szempontból is nagy jelentőségű lehet, de további megerősítést igényel nagyobb elemszámú mintacsoportban.

4.2. Új módszer kifejlesztése a mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosítására (szövetspecifikus target predikció) és útvonalelemzés mellékvesekéreg-daganatokban

Bár a mikroRNS expresszió eltérései patogenetikai eltéréseket jelezhetnek, a mikroRNS-ek biológiai jelentőségének igazolásához ezek cél mRNS-einek azonosítása szükséges. A számítógépes predikciós algoritmusokkal adott mikroRNS-eket elméletileg kötni képes *in silico* azonosított cél mRNS-ek száma túl nagy és ezek biológiai relevanciája nem ismert. A mellékvesekéreg-daganatokban igazolt 6 szignifikáns mikroRNS-re a három alkalmazott predikciós algoritmus (Targetscan, Pictar és MiRBase) összesen 17868 potenciális mRNS-t adott ki.

A célból, hogy az *in silico* kiválasztott cél mRNS-ek közül kiválaszthassuk azokat, amelyek biológiailag relevánsak lehetnek, egy **új, szövetspecifikus módszert dolgoztunk ki, amely ugyanazon mintákon végzett párhuzamos mikroRNS és mRNS expressziós mintázaton alapul.**

Ugyanazon 16 mintán, amelyen a mikroRNS mintázat meghatározásához a TLDA kártyákat használtuk, teljes genom génexpressziós (mRNS) microarray vizsgálatot is végeztünk Agilent 4x44 K kártyákon. A 4 vizsgálati csoportban 614 gén mutatott szignifikáns expressziós eltéréseket. Ezek között több, már korábban leírt gént találtunk, pl. az ACC-ben fokozott expressziót mutató *IGF-2*-t, a topoizomeráz 2A-t (*TOP2A*). **A microarray alapján nem expresszálódó mRNS-eket a potenciális mikroRNS cél mRNS-ek köréből kiszűrve a szóbajövő cél mRNS-ek számát jelentős mértékben tudtuk csökkenteni.** A szóbajövő cél mRNS-ek körét úgy csökkentettük tovább, hogy a mikroRNS-ekkel ellentétes változást mutató mRNS molekulákat kerestük. **GSEA módszerrel kerestük az eltérő változást mutató mRNS-eket, és ezzel 700-at sikerült kiválasztani,** ami már viszonylag jól kezelhető mennyiség. E potenciális cél mRNS-ek IPA útvonal elemzésével a **sejtciklus G2-M szabályozó pontjának károsodását mutattuk ki ACC-ben,** mint a mikroRNS-ek által első helyen befolyásolt patogenetikai utat. Meg kell azonban jegyezni,

de-2006-11
hogy e potenciális mikroRNS-mediált hatások csak bioinformatikai predikciók, amelyek igazolásához további, kísérleti vizsgálatok szükségesek.

4.3. *Phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata*

A mikroRNS expresszió mintázatát sporadikus benignus, MEN2 és VHL talaján kialakult benignus, valamint primer recidiváló phaeochromocytomák formalinban fixált, paraffinos szövetblokkjaiból izolált RNS-mintákban vizsgáltuk. Három paraffinos és fagyasztott mintapárban microarray korrelációs vizsgálatot végezve megállapítottuk, hogy a **paraffinos mintákból készített RNS-izolátumok alkalmasak a mikroRNS expresszió vizsgálatára phaeochromocytomákban**, ami e ritka daganatok vizsgálatát megkönnyítheti. 21 mintán végeztünk mikroRNS microarray vizsgálatot, majd a szignifikánsan változó mikroRNS-ek validálására és a mintaszám növelésére qRT-PCR-t használtunk. A microarray vizsgálat eredményeiben a GeneSpring 16, a Statistica 14 szignifikánsan változó mikroRNS-t talált, amelyek közül 11 volt átfedő. A qRT-PCR során ezek közül 5 mikroRNS validálását végeztük el és a vizsgálati csoportokat kiegészítettük NF1 betegekből származó mintákkal. Mind az 5 mikroRNS validálása sikeres volt: **a hsa-miR-541, hsa-miR-139-3p és hsa-miR-765 kifejeződése szignifikánsan magasabb volt VHL daganatokban a sporadikus benignus phaeochromocytomákhoz viszonyítva, míg a hsa-miR-885-5p fokozott kifejeződése MEN2-höz társult daganatokra volt jellemző. A hsa-miR-1225-3p szignifikánsan magasabb kifejeződést mutatott a recidiváló daganatokban**, a recidivára nem hajlamos daganatokhoz képest, ami esetleg felvetheti klinikai alkalmazásának lehetőségét a recidiva előrejelzésére, bár ehhez további, nagyobb elemszámon végzett vizsgálatok lennének szükségesek. Az 5 szignifikánsan változó mikroRNS-ekről csak nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. A hsa-miR-765 pl. az idegsejtek működésében, növekedésében is fontos neurotrophin-3 receptor expresszióját gátolhatja, ami a phaeochromocytomák patogenezisében is szerepet játszhat.

da-206-11

A mikroRNS-ek potenciális 206 mRNS-eit útvonal analízisnek alávetve kiemelendők a **recidíva patogenezisében jelzett Notch és G-fehérjéhez kapcsolt jelátviteli utak, amelyekre a hsa-miR-1225-3p gátló hatást fejthet ki.**

4.4. Funkcionális genomikai metaanalízis mellékvesekéreg-daganatokban

Mellékvesekéreg-daganatokban elemzésünk elkészültéig összesen 11 különböző mRNS expresszió és 10 CGH vizsgálatot közöltek. A génexpressziós vizsgálatok szignifikáns génlistái között néhány stabil, szinte valamennyi vizsgálatban megfigyelhető közös eltéréstől (pl. az *IGF-2* és topoisoméráz 2A (*TOP2A*) fokozott kifejeződése ACC mintákban) eltekintve számottevőek a különbségek, miáltal e vizsgálatok átfogó értelmezése és a daganatok patogenezisében fontos kórfolyamatok azonosítása nehéz. Metaanalízis keretében megkíséreltük e korábbi vizsgálatok újraelmzését és eredményeinek újraosztályozását, valamint a génexpressziós változások korrelációját kromoszómális eltérésekkel. Mivel a szakirodalomban addig nem közöltek olyan vizsgálatot, amelyben a génexpressziós és kromoszómális eltéréseket ugyanazon daganatokon vizsgálták volna, egy saját vizsgálatot végeztünk 11 daganatmintán párhuzamos mRNS microarray és CGH megközelítéssel a kromoszómaeltérésekkel párba állítható génexpressziós változások azonosítása céljából.

Komplex bioinformatikai elemzésünk eredményeként **három alapvető útvonalat** azonosítottunk ACC-ben mind a metaanalízis, mind saját párhuzamos mRNS microarray és CGH vizsgálatunk alapján: **1. a sejtciklus G1-S és G2-M szabályozó pontjainak zavara, 2. a retinoid jelátvitel eltérései és 3. immun-komplement eltérések.** A sejtciklus eltéréseit már korábban is leírták, a retinoid jelátvitel és az immun-komplement eltérések szerepe azonban új eredmény.

A sejtciklus vizsgálata során a **c-myc protoonkogén csökkent kifejeződését** észleltük szinte valamennyi vizsgálatban, és ezt a 8q24 kromoszómaregió elvesztésével tudtuk kapcsolatba hozni, ami az ACC-ben gyakori eltérés. Hálózat elemzés során a **c-myc a skálafüggetlen hálózatok**

ami arra utalhat, hogy a *c-myc* csökkent kifejeződése a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok alapvető patogenetikai eseménye lehet. Több kísérleti adat is alátámasztja a *c-myc* csökkent kifejeződését mellékvesekéreg-carcinomában.

Egy további érdekes eredmény a metaanalízisünk alapján **az exportin (XPO1) fokozott kifejeződése**. A XPO1 nukleáris transzportfehérje egyik funkciója a TOP2A fehérje citoplazmatikus transzlokációja. Fokozott kifejeződése a TOP2A fokozott citoplazmatikus megjelenéséhez vezethet, ami **a daganatsejtek citosztatikumokkal szembeni rezisztenciájában szerepet játszhat**. Az ACC citosztatikus kezelésében is használt doxorubicin és etopozid ugyanis a TOP2A-n keresztül fejt ki hatását, és utóbbinak citoplazmatikus halmozódása közrejátszhat az ACC citosztatikus kezelésének nehézségeiben.

A retinsav jelátvitel eltéréseit több útvonalban is észleltük. **Metaanalízisünk alapján elsőként írtuk le mellékvesekéreg-carcinomában a retinsav bioszintézisben szereplő enzimek és retinoid receptorok csökkent kifejeződését**. Ezek szerint az **ACC-t csökkent retinoid képződés és hatás jellemezheti**. A koleszterin/lipid bioszintézis és tárolás többszintű eltéréseit is megfigyeltük, ami a daganatok eltérő lipid tartalmában is szerepet játszhatnak és **a rosszindulatú daganatok benignusakhoz képest csökkent lipid tartalmát is magyarázhatják**.

A **harmadik fő patogenetikai útvonalnak az immun- és komplementrendszer eltérései** bizonyultak, ami ismét alátámasztja az immun-neuroendokrin interakciók mellékvese-daganatok patogenezisében játszott szerepét. Több antigénprezentációban és komplementrendszerben fontos gén megváltozott expresszióját észleltük, azonban ezek patogenetikai jelentősége kísérletes eredmények hiányában jelenleg nem tisztázott.

4.5. A hisztamin szerepe mellékvesekéreg-daganatokban

A hisztamin egy biogén amin, ami a gyulladásos-allergiás folyamatok egyik fő mediátora. Számos daganatban írták le a hisztamin patogenetikai szerepét, és többnyire a malignus daganatokban (pl. melanoma malignum, vastagbélrák), fokozott hisztaminhatást mutattak ki. Korábbi

dc_206_11
vizsgálatokban leírták a **hisztamin** bioszintéziséért felelős hisztidin dekarboxiláz (HDC) expresszióját és a hisztamin receptorait a mellékvesevelőben. Nem voltak azonban adatok ismertek a HDC, a hisztaminreceptorok (HRH1-4) és a hisztamin lebontásáért felelős enzimek (hisztamin N-metil transzferáz (HNMT) és diamin-oxidáz (DAO)) kifejeződéséről ép humán mellékvesekéregben és daganataiban.

Valamennyi hisztamin bioszintézisben, hatásban és lebontásban szerepet játszó gén ill. fehérje expresszióját kimutattuk az ép mellékvesekéregben, ami arra utal, hogy a teljes hisztaminerg apparátus jelen van. Eredményeink szerint a **hisztamin fő forrásának** a mellékvesekéregben maguk a **mellékvesekéreg sejtek tarthatók**. A HDC expressziója az ép mellékvesekéregben volt a legmagasabb, a daganatokban, különösen ACC-ben csökkent volt és ezzel párhuzamosan a **daganatok hisztamintartalma is csökkent** volt. A hisztaminreceptorok között a 2-es típusú receptor (HRH2) kifejeződése a jóindulatú daganatokban, míg a 4-es típusú (HRH4) a kortizoltermelőkhben szignifikánsan csökkent volt a ép szövethez és a többi daganathoz képest. A **HRH3 expresszió** ugyanakkor a **rosszindulatú daganatokban szignifikánsan magasabb volt**.

Eredményeink szerint a **rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokat csökkent hisztamintermelés és tartalom jellemzi**, ami szemben áll azon daganatokkal, ahol a hisztamin daganatképződést elősegítő hatású. E megfigyelésünk is jelezheti, hogy a mellékvesekéreg több tekintetben is eltérően viselkedik más szervektől.

4.6. *In silico* genomikai vizsgálatok

A hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szereplő fehérjék génjei

A HDC, a hisztaminreceptorok (HRH1-4), a HNMT és a DAO szekvenciavariánsait *in silico* megközelítéssel kerestük. Számos már leírt és több új variánst azonosítottunk mind a nem kódoló, mind a kódoló szekvenciákban. A **HRH4 génjében talált három variáns közül az Ala138Val és His206Arg variánsokat elsőként írtuk le és ezeket később populációgenetikai vizsgálatok során megerősítették.** A hisztamin lebontásában szerepet játszó enzimek közül a DAO *in silico* észlelt szekvenciavariánsai között a **Ser332Phe variánst később populációgenetikai vizsgálatokban megerősítették.**

A szteroidhormonok bioszintézisében és lebontásában szereplő enzimek

A szteroidhormonok bioszintézisében és lebontásában) szereplő enzimek között nagyszámú szekvencia variánst találtunk. a nem kódoló szakaszokon pl. 59-et a **HSD11B2**-ben (11 β -hidroxisteroid dehidrogenáz 2), 53-at a **CYP19**-ben (aromatáz) és 77-et a **CYP17**-ben (17-hidroxiláz). A kódoló szekvenciákat érintő szekvencia variánsok között mind aminosavcserével járó, mind „csendes” szekvencia variánsokat észleltünk. A **HSD3B1 (3 β -hidroxisteroid dehidrogenáz 1) gén Asn367Thr variánsát későbbi vizsgálatokban igazolták** és afroamerikai valamint kaukázusi népességben 10 % feletti allélgyakoriságot állapítottak meg. A **kortizolszintézis utolsó lépését katalizáló enzimet kódoló CYP11B1 (11 β -hidroxiláz 1) génben egy másik *in silico* variánsunkat is igazolták (Arg43Gln).**

Glükokortikoidreceptor

A glükokortikoidreceptor exonjait, intronjait, a glükokortikoidreceptor α és β mRNS-ét vizsgáltuk *in silico* módszerrel. A kódoló szakaszokon 8 szekvencia variánst találtunk, ezek közül három csendes polimorfizmus volt ismert (His588His, Asp678Asp és Asn766Asn). Valamennyi szekvencia variáns a fehérje hormonkötő régióját befolyásolta. E szekvencia variánsok potenciális funkcionális következményeit háromdimenziós molekuláris modellezéssel vizsgáltuk. A Met646Thr *in*

dc.206.11
silico azonosított szekvencia variáns közvetlenül a dexametazon kötését érintené. A Leu647Pro a ligandkötésben alapvető hidrofób zsebet módosíthatja. Érdekes, hogy az Ile701Leu és a Phe715Cys szekvencia variánsokat ugyanazon csírasejtes nukleotidszekvenciában találtuk, és ezek egyidejű jelenléte is a ligandkötést befolyásolhatja. Mindazonáltal ezen *in silico* eredmények validálása kísérletes vizsgálatokat igényel.

A multiplex endokrin neoplasia 1-es és 2-es típusáért felelős gének

A MEN1 szindróma kialakulásáért felelős *MEN1* és a MEN2-ért felelős *RET* gének nem kódoló szakaszaiban 54 ill. 36 variánszt találtunk. Ezek mind az 5' és 3' nem kódoló régiókban, mind számos intronban előfordulnak, azonban ismert szabályozó elemekkel nem sikerült őket kapcsolatba hoznunk. A *RET* protoonkogénben 4 eddig ismeretlen szekvencia variánszt azonosítottunk. A *MEN1* génben is négy szekvencia variánszt találtunk: Phe416Leu és Gln584Pro aminosavcserével járó valamint a His433His és Ser512Ser csendes variánsokat. **Érdekes, hogy a His433His variánszt szomatikus variánsként már leírták sporadikus hypophysis daganatban, mi azonban csírasejtes variánsként észleltük és később ezt populációgenetikai vizsgálattal megerősítették.** Mivel a gének termékeinek háromdimenziós szerkezete még nem ismert, ezen *in silico* variánsok jelentőségére nem következtethetünk.

4.7. Citokinek és receptoraik vizsgálata hypothalamikus GnRH-neuronokban: az oncostatin M (OSM) jelentősége

A hypothalamikus GnRH neuronok citokin és citokinreceptor expressziós mintázata vizsgálatunkat megelőzően nem volt ismert. A GnV-4 sejtvonalat felnőtt patkány hypothalamikus GnRH neuronok kondicionális immortalizációja révén állították elő. E sejtek citokin és citokinreceptor expresszióját RT-PCR-rel vizsgáltuk. A receptorok között az **IL-1 mindkét receptorát, az IL-2 receptor γ alegységét, valamint az IL-6 receptorcsaládba tartozó közös gp130 jelátviteli alegységet, az IL-6 és oncostatin M (OSM) receptorát tudtuk kimutatni.** A citokinek közül az IL-6 mRNS-ét találtuk meg, ami az IL-6 esetében autokrin szabályozás lehetőségét veti fel. E receptorok közül az OSM receptorának expressziója

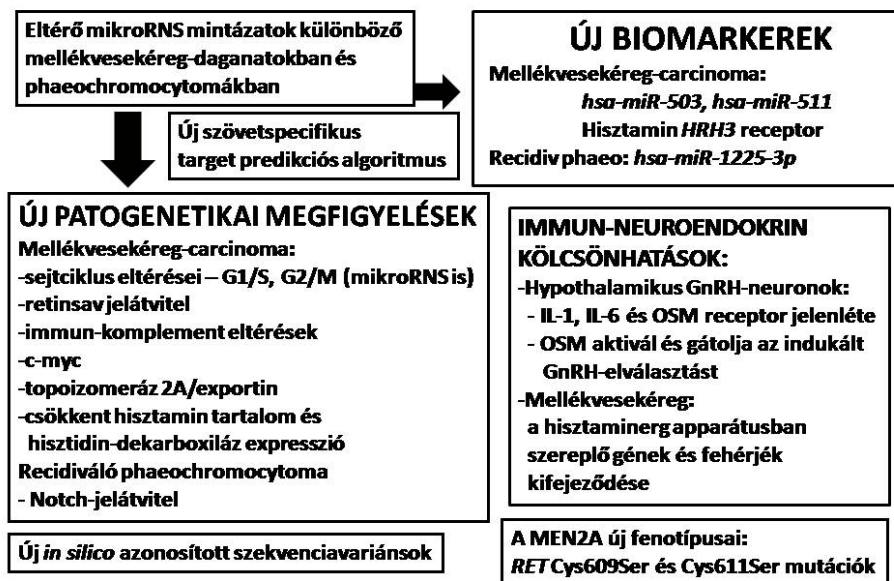
de.2006.11
túnt a legérdekesebbnek, mivel ennek központi idegrendszeri kifejeződéséről eddig kevés adat volt, legmagasabb fokú expresszióját a bulbus olfactorisban írták le. Mivel a hypothalamikus GnRH neuronok is az olfactoricus plakod területéről származnak, e megfigyelés fejlődéstani szempontból is érdekes. Az OSM több korai gén expresszióját (*c-fos*, *Egr-1*, *GADD45G*, *MKP-1*), valamint a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) jelátviteli utat indukálta. Az OSM és valamennyi kezelésben jóval hatékonyabb volt az IL-6-nál. Bár az **OSM** önmagában nem befolyásolta a GnRH mRNS expresszióját, **az N-metil-D-aszpartát (NMDA) indukálta GnRH mRNS expresszió növekedést dózisfüggően, hatékonyan gátolta.** Eredményeink szerint az OSM szerepet játszhat a GnRH-neuronok működésének szabályozásában és akár a betegségek ill. stresszhelyzetek hatására bekövetkező reproduktív aktivitás csökkenésében is.

4.8. MEN2A-szindrómában szenvedő betegek vizsgálata

Multiplex endokrin neoplasia 2-es típusában elsőként írtuk le a RET 609-es kodon mutációt (TGC609TCC, Cys609Ser) hordozó családban phaeochromocytoma előfordulását, mivel addig a 609-es kodon mutációit a phaeochromocytomára nem hajlamosító RET mutációk között tartották számon. A szintén 10-es exonban előforduló TGC611TAC (Cys611Tyr) mutáció esetén egy különös fenotípust írtunk le bilaterális phaeochromocytoma és hyperparathyreosis társulásával, ugyanakkor a MEN2A legnagyobb penetranciát mutató eltérését, a medulláris pajzsmirigyrákot a betegben nem észleltük. Mindezen megfigyelések a MEN2-höz vezető RET protoonkogén mutációkkal társuló különböző klinikai fenotípusok széles spektrumát és a geno-fenotípus összefüggések további kutatásának jelentőségét jelzik.

5. ÖSSZEFOGLALÁS, VIZSGÁLATAIM FŐ MEGÁLLAPÍTÁSAI

Vizsgálataimban az endokrin daganatok és az immun-neuroendokrin kölcsönhatások területén több új megfigyelést tettünk:



A mellékvese daganataiban a világon elsők között vizsgáltuk a mikroRNS-ek expressziós mintázatát.

1. Megállapítottuk, hogy az ép mellékvesekéreg, a jóindulatú hormonálisan inaktív és kortizoltermelő, valamint a mellékvesekéreg-carcinoma mikroRNS expressziós mintázata szignifikáns eltéréseket mutat.
2. A jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok elkülönítésére alkalmas mikroRNS markereket azonosítottunk, amelyek közül a *hsa-miR-503* és *hsa-miR-511* expressziós különbsége bizonyult leghatékonyabbnak. Mivel a mellékvesekéreg-daganatok szövettani vizsgálata, a rosszindulatúság megállapítása nehéz, e mikroRNS marker gyakorlati szempontból is hasznos lehet.

3. Sporadikus benignus, recidiváló benignus (multiplex endokrin neoplasia 2, von Hippel-Lindau szindróma és neurofibromatosis 1 talaján kialakult) valamint sporadikus recidiváló phaeochromocytomák között szignifikáns mikroRNS expressziós eltéréseket találtunk.
4. Igazoltuk, hogy a paraffinos formalin-fixált szövetblokkokból izolált RNS alkalmas a phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálatára
5. A *hsa-miR-1225-3p* vizsgálata a recidivára hajlamos és nem recidiváló phaeochromocytomák elkülönítésére alkalmas lehet, ami gyakorlati szempontból hasznos lehet.

A mikroRNS-ek biológiai jelentőségének vizsgálatára bioinformatikai elemzéseket végeztünk.

6. Ugyanazon mintákon végzett párhuzamos mikroRNS és mRNA expressziós vizsgálatok végzésével új, szövetspecifikus mikroRNS target predikciós módszert dolgoztunk ki. Ennek során a nem expresszálandó mRNS-ek kiszűrésével és az ellentétesen változó mikroRNS-ek és mRNA-ek azonosítása révén szűkítettük a szóbjövő mRNS-ek körét. A mellékvesekéreg-carcinoma és adenomák között szignifikánsan eltérő mikroRNS-ek bioinformatikai elemzésével a sejtciklus G2-M ellenőrzőpontjának károsodását mutattuk ki, mint a mikroRNS-ek által befolyásolt, mellékvesekéreg-carcinomában fontos patogenetikai eltérést.
7. A phaeochromocytoma recidivájában fontos *hsa-miR-1225-3p* bioinformatikai elemzésével a Notch-jelátviteli út jelentőségét mutattuk ki.

A mellékvesekéreg-daganatok patogenetikai útjainak vizsgálatára **bioinformatikai metaanalízist végeztünk**, valamint az mRNA expressziós és citogenetikai eltérések korrelációja céljából saját vizsgálatot is végeztünk ugyanazon mintákon végzett mRNA microarray és komparatív genom hibridizáció végzésével.

- de 2006. 11. 11.
8. A metaanalízis eredménye szerint három fő patogenetikai utat azonosítottunk mellékvesekéreg-carcinomában: 1. a sejtciklus G1/S és G2/M ellenőrzőpontjainak károsodását, 2. a retinsav jelátvitel eltéréseit és 3. az immun-komplement rendszer eltéréseit. A G2/M ellenőrzőpont károsodásában a mikroRNS-ek szerepét is kimutattuk.
 9. A topoizomeráz 2A és exportin kifejeződésének fokozódása a mellékvesekéreg-carcinoma citosztatikus kezeléssel szembeni rezisztenciájának magyarázatában szóba jövő új molekuláris mechanizmus.
 10. Hálózatelemzés a c-myc protoonkogén csökkent kifejeződését, mint a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisének központi elemét azonosítottuk.

A gyulladásos mediátor hisztamin jelentőségét elsőként vizsgáltuk mellékvesekéreg-daganatokban:

11. A hisztamin bioszintézisért felelős hisztidin dekarboxiláz kifejeződése és a hisztamin koncentrációja is kisebb mértékű volt a mellékvesekéreg-daganatokban, mint az ép szövetben, legalacsonyabbnak a carcinoma szövetekben találtuk.
12. A hisztamin receptorai között szignifikáns eltéréseket találtunk, a H3 receptor kifejeződése a rosszindulatú daganatokra volt jellemző, ami akár a rosszindulatúság markereként történő felhasználását is felvetheti.
13. Az ép mellékvesekéregben a hisztamin fő forrását maguk a mellékvesekéreg sejtjei képezik és a hisztamin hatásához és lebontásához szükséges fehérjék mind jelen vannak, ami felveti a hisztamin jelentőségét a mellékvesekéreg élettani folyamataiban.

Hypothalamikus GnRH-neuronok és a citokinrendszer kapcsolatának vizsgálata az immun-neuroendokrin kölcsönhatások keretében.

14. A hypothalamikus GnRH-neuronokon több citokin receptorát mutattuk ki mRNS szinten (interleukin-6, oncostatin M, interleukin-1).
15. Az oncostatin M aktiválta a sejtek korai gén expresszióját, a mitogén aktiválta protein kináz jelátviteli utat és gátolta az N-metil-D-aszpartát indukálta GnRH elválasztást, így szerepet játszhat a hypothalamikus GnRH-neuronok működésének szabályozásában.

***In silico* genomikai vizsgálatok** során a hisztaminnal kapcsolatos gének, a szteroidhormon bioszintézis és metabolizmus enzimeinek génjei, a glükokortikoidreceptor, valamint a multiplex endokrin neoplasia 1-es és 2-es típusának génjeit vizsgáltuk. Mivel ezek *in silico* variánsok, igazolásukhoz populációgenetikai és kísérletes vizsgálatok szükségesek.

16. A hisztamin bioszintetikus enzim, receptorai és lebomlásában szereplő fehérjék génjeiben több már ismert és új variánst azonosítottunk.
17. A szteroidhormon bioszintézisben és metabolizmusban szereplő enzimek génjeinek vizsgálatával több ismert és új variánst találtunk.
18. Mind a hisztaminnal, mind a szteroidhormon bioszintézissel kapcsolatos gének *in silico* módszerünkkel azonosított variánsai közül néhányat későbbi populációgenetikai vizsgálatokkal igazoltak, ami módszerünk alkalmazhatóságát jelezheti.
19. A glükokortikoidreceptor génjében is több variánst találtunk. Mivel a glükokortikoidreceptor ligandkötő régiójában háromdimenziós térszerkezete ismert, itt lehetőségünk nyílt egyes *in silico* variánsok potenciális molekuláris hatásainak vizsgálatára is.
20. A MEN1 és MEN2 szindrómáért felelős génekben is több ismert és potenciálisan új variánst azonosítottunk.

Klinikai genetikai vizsgálatok a multiplex endokrin neoplasia szindróma 2-es (MEN2) típusában

21. Hazánkban az elsők között végeztünk genetikai vizsgálatot a MEN2A szindróma igazolására.
22. Két új klinikai fenotípust azonosítottunk:
 - 22A:** Elsőként írtuk le phaeochromocytoma előfordulását a *RET* protoonkogén 10-es exon 609-es kodon mutációja esetén.
 - 22B:** A *RET* protoonkogén 10-es exon 611-es kodon Cys611Tyr mutációja esetén kétoldali phaeochromocytoma és primer hyperparathyreosis társulását írtuk le medulláris pajzsmirigyrák megjelenése nélkül.

5.1. *Eredményeim potenciális klinikai-gyakorlati hasznosítási lehetőségei*

Diagnosztikai jelentőség:

1. A mellékvesekéreg-daganatok rosszindulatúságát jelző mikroRNS biomarkerek (*hsa-miR-503*, *hsa-miR-511*) a szövettani vizsgálat hasznos kiegészítői lehetnek a mellékvesekéreg-carcinoma diagnózisában.
2. A paraffinos szövetblokkokból izolált RNS minták alkalmasak a mikroRNS mintázat meghatározására phaeochromocytomában.
3. A recidiváló phaeochromocytomákra jellemző *hsa-miR-1225-3p* fokozott kifejeződésének kimutatása a betegek szorosabb követését teheti indokolttá.
4. A mellékvesekéreg-carcinoma fokozott hisztamin *HRH3* receptor kifejeződése a rosszindulatúság markere lehet.
5. A *RET* protoonkogén 10-es exon 609-es kodon mutációi esetén is szükséges az érintettek phaeochromocytoma irányú szűrése.
6. A *RET* protoonkogén egyes mutációi esetén a medulláris pajzsmirigyrák penetranciája csökkent.

Kezelési jelentőség:

7. Az onkogén, ill. tumorsuppresszor hatású mikroRNS-ek esetleg terápiás célpontként jöhetnek szóba a jövőben a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében.
8. A mellékvesekéreg-daganatok funkcionális genomikai metaanalízise során azonosított útvonalak közül a retinsav jelátvitel befolyásolása a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében új gyógyszeres beavatkozási lehetőségét jelezheti.
9. A phaeochromocytoma recidiva patomechanizmusában felvetődő Notch-jelátviteli út befolyásolása a phaeochromocytomák ez irányú gyógyszeres kezelési lehetőségét vetheti fel.

6. Az értekezést megadók közlemények listája:

6.1. Idegen nyelvű folyóiratcikkek ΣIF: 40,04

PhD értekezésben szereplő közlemény:

1. **Igaz P;** Tóth S; Falus A
Interplay between the immune and neuroendocrine systems.
MEDICAL SCIENCE MONITOR 4: 728-733.
1998
-

PhD fokozat elnyerése (1999) óta született közlemények:

2. **Igaz P;** Falus A; Gláz E; Rácz K
Cytokines in diseases of the endocrine system.
CELL BIOL INT 24: 663-668.
2000 **IF: 0,592**
3. **Igaz P;** Novák I; Lázár E; Horváth B; Héninger E; Falus A
Bidirectional communication between histamine and cytokines.
INFLAMMATION RESEARCH 50: 123-128,
2001 **IF: 1,325**
4. **Igaz P;** Fitzimons CP; Szalai Cs; Falus A
Histamine genomics in silico: Polymorphisms (sequence variants)
of the human genes involved in the synthesis, action and
degradation of histamine.
AM J PHARMACOGENOMICS 2 (1): 67-72.
2002
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".
J ENDOCRINOL INVEST 25: 609-613.
2002 **IF: 1,476**

6. **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.
J STEROID BIOCHEM MOL BIOL 82: 359-367.
2002 **IF: 2,637**

7. Likó I; **Igaz P**; Patócs A; Tóth S; Pázmány T; Tóth M; Rácz K
Sequence variants of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor gene and their functional consequences on three-dimensional protein structure.
CURR MED CHEM 11: 3229-3237.
2004 **IF: 4,382**

8. **Igaz P**; Gaillard RC
Génétique des néoplasies endocriniennes multiples: implications cliniques.
REVUE MÉDICALE SUISSE 1 (febr. 9.): 408-413.
2005

9. **Igaz P**; Salvi R; Rey JP; Glauser M; Pralong FP; Gaillard RC
Effects of cytokines on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in primary hypothalamic neurons and in GnRH neurons immortalized conditionally.
ENDOCRINOLOGY 147: 1037-1043.
2006 **IF: 5,236**

10. **Igaz P**; Wiener Z; Szabó P; Falus A; Gaillard RC; Horányi J; Rácz K; Tulassay Zs:
Functional genomics approaches for the study of sporadic adrenal tumour pathogenesis. Clinical implications.
J STEROID BIOCHEM MOL BIOL 101: 87-96.
2006 **IF: 2,825**

11. Tömböl Z; Szabó PM; Molnár V; Wiener Z; Tölgyesi G; Horányi J; Riesz P; Reismann P; Patócs A; Likó I; Gaillard RC; 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, 895-906
2009 **IF: 4,282**

12. Szabó PM; Wiener Z; Tömböl Z; Pócza P; Kovács A; 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, 133-142
2009 **IF: 2,305**

13. Szabó PM; Tömböl Z; Molnár V; Falus A; Rácz K; **Igaz P**:
MicroRNA target prediction: problems and possible solutions.
CURRENT BIOINFORMATICS 5, 81-88
2010 **IF: 0,976**

14. 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, 3163-3172
2010 **IF: 7,414**

15. Tömböl Z; Éder K; Kovács A; Szabó PM; 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
MOD PATHOL, 23, 1583-1595
2010 **IF: 4,176**

16. Szabó PM; Rácz K; **Igaz P**: 11
 Underexpression of c-myc in adrenocortical cancer: a major pathogenic event?
 HORM METAB RES, 43, 297-299
 2011 **IF (2010): 2,414**
17. Zsippai A; Szabó DR; Szabó PM; Tömböl Z; Bendes MR; Nagy Z; Rácz K; **Igaz P**:
 mRNA and microRNA expression patterns in adrenocortical cancer
 AM J CANCER RES, 1, 618-628
 2011

6.2. Magyar nyelvű folyóiratszettek:

1. **Igaz P**; Rácz K; Tóth M; Cserepes É; Ésik O; Kiss R; Perner F; Gláz E; Tulassay Zs: Molekuláris genetikai módszerekkel igazolt ret protoonkogén mutáció magyar MEN2A család esetében.
 ORVOSI HETILAP 140: 355-357
 1999
2. Szabó P; Rácz K; Tulassay Zs; **Igaz P**
 A funkcionális genomika lehetőségei a mellékvese és hypophysis daganatok patogenezisének vizsgálatában.
 ORVOSI HETILAP 147: 1267-1271.
 2006
3. Tömböl Z; Szabó P; Rácz K; Tulassay Z; **Igaz P**:
 A mikro-RNS-ek jelentősége daganatos betegségekben.
 ORVOSI HETILAP 148, 1135-1141.
 2007
4. Szabó D; Zsippai A; Bendes M; Tömböl Z; Szabó PM; Rácz K; **Igaz P**:
 A mellékvesekéreg-carcinoma molekuláris patogenezise
 ORVOSI HETILAP, 151, 1163-1170
 2010

5. Zsippai A; Szabó D, Szabó PM; Tömböl Z; Rácz K; **Igaz P**:
Génexpressziós vizsgálatok mellékvesekéreg-daganatokban
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM, 63, 425-434
2010

6.3. Az értekezéshez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások:

1. **Igaz P**; Patócs A; Rácz K; Klein I; Váradi A; Ésik O
Occurence of pheochromocytoma in a MEN2A family with codon
609 mutation of the RET protooncogene. [letter]
J CLIN ENDOCRINOL METAB 87: 2994.
2002
2. **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
3. Tömböl Z, Szabó PM, Patócs A, Rácz K, **Igaz P**: Differences in
microRNA expression profiles of adrenocortical tumors - Letter
CLIN CANCER RES 16, 2915
2010

6.4. Az értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek:

1. **Igaz P**, Hegyesi H
Histamine H1, H2, H3, H4 receptors and the potential "Hic"
(intracellular) receptor. Coding genes and gene products, "in silico"
and experimental data.
pp. 69-77. In: Falus A (ed.): Histamine: Biology and Medical
Aspects. Karger-Springmed Publishing. ISBN 3-8055-7715-X,
2004

2. **Igaz P**, Falus A dc_206_11
Cytokines, chemokines and histamine.
pp. 112-118 . In: Falus A (ed.): Histamine: Biology and Medical Aspects. Karger-Springmed Publishing. ISBN 3-8055-7715-X, 2004
3. Falus A, Hegyesi H, Darvas S, Pós Z, **Igaz P**
Histamine genomics and metabolomics.
pp. 371-394. In: Falus A (ed.). Immunogenomics and Human Disease. John Wiley & Sons, ISBN-13978-0-470-01530-6, ISBN: 10 0-470-01530-6, 2006
4. **Igaz P**
In silico hisztamin genomika: szekvenciapolimorfizmusok a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szerepet játszó enzimek és receptorok nukleotid szekvenciáiban.
pp. 289-292. In: Falus András (szerk.): Fejezetek a genom-léptékű biológiából és orvostudományból., Semmelweis kiadó, Budapest, ISBN 963 9656 19 4, 2006
5. **Igaz P; Tulassay Zs**
Endokrin daganatok.
In: Hatóanyagok-készítmények-terápia, fókuszban az onkológia és onkohaematológia. Melinda kiadó, Dank Magdolna, Demeter Judit (szerk.) Budapest, 343-350. old. ISBN 963 85822 2 , 2006
6. **Igaz P:**
MEN1 Clinical Background.
In SuperMEN1: Pituitary, Parathyroid and Pancreas.
Balogh K, Patócs A (Eds.) Landes Bioscience-Spinger, New York, Austin, 1-15 old., ISBN 978-1-4419-1662-4, 2009

7. **Igaz P:** dc_206_11
Phaeochromocytoma.
In: Az endokrin- és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve.
Leövey A, Nagy E, Paragh Gy, Rácz K (szerk.). Medicina,
Budapest, 328-228 old.
ISBN 978963226 277 2, 2011
8. Rácz K, Tóth M, **Igaz P:**
Endokrin daganatok In: Az onkológia tankönyve, Tulassay Z
(szerk.) Semmelweis Kiadó – megjelenés alatt

7. Az értekezésben nem szereplő folyóiratcikkek listája:

- 1.. **Igaz P**; Tóth S; Csaba G
Long-lasting persistence of elevated sister-chromatid exchange frequencies induced by perinatal benzo(a)pyrene treatment in rat bone-marrow cells.
EXPERIENTIA 51: 612-615.
1995 **IF: 1,643**
2. Múzes Gy; **Igaz P**
Apoptosis az immunfolyamatok regulációjában és az autoimmun betegségek patogenezisében.
ORVOSI HETILAP 21: 1315-1320.
1997
3. **Igaz P**; Fejér G; Szalai Cs; Tóth S; Falus A
Development of a competitive mRNA PCR for the quantification of interleukin-6 responsive junB oncogene expression.
BIOTECHNIQUES 24: 854-860.
1998 **IF: 1,707**
4. **Igaz P**; Tóth S; Madurka I; Falus A
Az interleukin-6 különbözőképpen fejti ki hatását szolubilis és membránreceptorán keresztül.
ORVOSI HETILAP 139 (29): 1741-1744
1998
5. **Igaz P**; Tóth S; Rose-John S; Fejér G; Szalai Cs; Falus A
Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor influences the expression of the protooncogene junB and the production of fibrinogen in the HepG2 human hepatoma cell line and primary rat hepatocytes.
CYTOKINE 10: 620-626.
1998 **IF: 2,008**

6. **Igaz P**; Dérfalvi Cs; Tóth S; Falus A
 Growth hormone inhibits the interleukin-6 induced junB protooncogene and fibrinogen expression in HepG2 human hepatoma cells.
 ACTA BIOLOGICA HUNGARICA 49: 113-118.
 1998

7. Falus A; **Igaz P**; Szalai Cs; Holub M; Varga V; Tóth S
 Az "interleukin-6" citokincsalád jelátvitelének pozitív és negatív szabályozása.
 BIOKÉMIA márc.: 7-10.
 1998

8. **Igaz P**; Tóth M; Meződy M; Péntes I; Gláz E; Rácz K; Tulassay Zs
 Hatásos demeclocyclin therapia koponyatraumát követően kialakult SIADH esetében.
 ORVOSI HETILAP 140: 2873-2875
 1999

9. **Igaz P**; Tóth S; Falus A
 Soluble Interleukin-6 receptor and its clinical significance.
 IPPOCRATE 1 (2): 63-71
 1999

10. **Igaz P**; Horváth A; Horváth B; Szalai Cs; Pállinger É; Rajnavölgyi É; Tóth S; Falus A
 Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) makes IL-6R negative T cell line respond to IL-6; it inhibits TNF production.
 IMMUNOL. LETT. 71: 143-148.
 2000 **IF: 1,546**

11. **Igaz P**
 Fötale Zellen und die Pathogenese von Sclerodermie: Microchimärismus, Mechanismen von Alloimmunität.
 WIENER MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT 150: 101-102.
 2000

12. **Igaz P; Falus A; Lóth S; Falus A**
 Interleukin-6 induced production of type II acute-phase proteins and expression of junB are down-regulated by human recombinant GH in vitro.
 CELL BIOL INT 24: 109-114.
 2000 **IF: 0,592**

13. **Igaz P; Tóth M; Rácz K; Tulassay Zs**
 Fanconi-szindróma talaján kialakult 1-es típusú D-vitamin-dependens rachitis fiatal nőbetegben.
 MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 2000/3, 214-215.
 2000

14. **Igaz P**
 Die Induktion oraler Toleranz: eine neue Therapiestrategie von Autoimmunerkrankungen?
 WIENER MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT 150: 440-443.
 2000

15. **Igaz P**
 Xenotranszplantáció: utópia vagy klinikai realitás?
 ORVOSI HETILAP 141: 2759-2765.
 2000

16. **Igaz P**
 Xenotransplantes: ¿la solución para la escasez de órganos donados?
 REVISTA DE MEDICINA GENERAL 28: 856-863.
 2000

17. **Igaz P**
 Antimikrobiális peptidek: új lehetőség a bakteriális fertőzések leküzdésére?
 ORVOSI HETILAP 142: 169-171.
 2001

18. **Igaz P**; Bősze SZ; Tóth S; Falus A; Hudecz F
C-terminal peptides of interleukin-6 modulate the expression of
junB protooncogene and the production of fibrinogen by HepG2
cells.
BIOLOGICAL CHEMISTRY 382: 669-676.
2001 **IF: 2,606**

19. **Igaz P**
Die Xenotransplantation von Langerhans-Inseln: eine mögliche
Therapie für Diabetes mellitus?
WIENER MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT 151: 291-294.
2001

20. **Igaz P**; Tóth S; Falus A
Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway;
lessons from knockout mice.
INFLAMMATION RESEARCH 50: 435-441
2001 **IF: 1,325**

21. **Igaz P**
Recent strategies to overcome the hyperacute rejection in pig to
human xenotransplantation.
YALE J BIOL MED 74 (5), Sept-Oct: 329-340.
2001

22. **Igaz P**; Múzes G
Az immunrendszeri apoptosira ható gyógyszerek az
immunrendszerben.
ORVOSI HETILAP 142: 2829-2833.
2001

23. Holub MC; Hegyesi H; **Igaz P**; Polgár A; Tóth S; Falus A
Soluble interleukin-6 receptor enhanced by oncostatin M induces
major changes in gene expression profile of human hepatoma cells.
IMMUNOL LETT 82: 79-84.
2002 **IF: 1,847**

24. Bősze Sz; Hudecz F; Igaz P; Lobisch Zs; Csík G; Tóth S; Falus A
Interleukin-6 N-terminal peptides modulate the expression of junB
protooncogene and the production of fibrinogen on HepG2 cells.
BIOL CHEM 384: 409-421.
2003 IF: 3,366

25. Bősze S; **Igaz P**; Tóth S; Csík G; Szabó S; Ortutay Z; Falus A;
Hudecz F
Effect of synthetic IL-6 peptides on junB expression and fibrinogen
production of HepG2 cells: A minireview.
CHIMICA OGGI-CHEMISTRY TODAY 21: 27-34.
2003 IF: 0,283

26. Patócs A; Valkusz Z; **Igaz P**; Balogh K; Tóth M; Majnik J; Varga
I; Rácz K
Segregation of V804L mutation and S836S polymorphism of exon
14 of the RET gene in an extended kindred with familial medullary
thyroid cancer.
CLIN GENET 63: 219-223.
2003 IF: 2,025

27. **Igaz P**; Rácz K; Tulassay Zs
Autoimmun poliendokrin szindrómák és rokon kórképek:
patogenezis és klinikai kép.
ORVOSI HETILAP 146: 1531-1538.
2005
Markusovszky-díjjal kitüntetett közlemény.

28. **Igaz P**; Tulassay Zs
Hypercalcaemia malignus és granulomatosus betegségekben:
patogenezis és kezelés.
ORVOSI HETILAP 146: 1631-1634.
2005

29. **Igaz P**; Igaz I; Rácz K; Tulassay Zs
Az endokrin pancreas öröklődő daganatai.
ORVOSI HETILAP 147: 195-200.
2006

30. **Igaz P;** Rác K; Szabolcs Z; Tulassay Zs
A Carney-komplex, a multiplex endokrin neoplasia szindrómák ritka formája: klinikai kép és kóreredet.
ORVOSI HETILAP 147: 551-556.
2006

31. Patócs A; Klein I; Szilvási A; Gergics P; Tóth M; Valkusz Z; Fórizs E; **Igaz P;** Al-Farhat Y; Tordai A; Váradi A; Rác K; Ésik O
Genotype/phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer.
WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT 118: 417-421.
2006 **IF: 0,804**

32. **Igaz P;** Rác K; Tóth M; Gláz E; Tulassay Zs:
A iatrogén Cushing-szindróma kezelése: a glukokortikoid terápia leépítésének kérdései.
ORVOSI HETILAP 148: 195-202.
2007

33. **Igaz P,** Rác K, Tulassay Z:
Hatékony somatostatin analóg kezelés hormonálisan inaktív carcinoid daganatos betegben: a szérum chromogranin A alkalmazása a klinikai követés során.
ORVOSI HETILAP 148, 2343-2246.
2007

34. **Igaz P;** Tóth M; Rác K; Tulassay Z:
A primer hyperparathyreosis kezelésének új szemlélete – a gyógyszeres kezelés lehetőségei.
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM 61, 36-41
2008

35. **Igaz P;** Tulassay Z:
A gastroparesis és kezelésének lehetőségei.
ORVOSI HETILAP149, 393-398
2008

36. **Igaz P; Tulassay Z; 2006_11**
Az autoimmun pancreatitis.
ORVOSI HETILAP 149, 873-876
2008
37. **Igaz P; Szücs N; Rettegny T; Leiszter K; Hagymási K; Rácz K;**
Tulassay Z:
Non-hepatic coma in a cirrhotic patient due to chronic subdural
hematoma. HUNGARIAN MED JOURNAL 2, 451-453
2008
38. **Igaz P; Rácz K; Tulassay Z:**
Az emésztőrendszeri carcinoid daganatok gyógyszeres kezelésének
lehetőségei
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM 61, 379-383.
2008
39. **Igaz P; Rácz K; Tulassay Z:**
A férfi fogamzásgátlás hormonális lehetőségei.
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM 61, 384-388
2008
40. **Igaz P; Tömböl Z; Szabó PM; Likó I; Rácz K:**
Steroid biosynthesis inhibitors in the therapy of hypercortisolism:
theory and practice.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 15, 2734-2744
2008 – **Richter Gedeon Publikációs Pályadíjjal kitüntetett**
közlemény **IF: 4,823**
41. Sallai Á; **Igaz P;** Patócs A; Gergics P; Rácz K; Fekete G
Profilaktikus thyreoidectomy gyermekkorban
GYERMEKGYÓGYÁSZAT 59, 109-113
2008
42. **Igaz P; Rácz K:**
Carcinoid tumorok: sokszínű megjelenés és kezelési lehetőség
LEGE ARTIS MEDICINAE, 19, 493-495
2009

43. **Igaz P; Rácz K; Tulassay Z**
Az elhízás gyógyszeres kezelése.
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM 62, 5-8
2009
44. Pregun I; Gergics P; Dabasi G; **Igaz P; Rácz K; Tulassay Z**
Serum chromogranin A reflects regression of metastatic carcinoid
during prolonged octreotide treatment
EUR J GASTROENTEROL HEPATOL 21, 386-387
2009 **IF: 1,662**
45. Mondok A; Tóth M; Patócs A; Szücs N; **Igaz P; Pusztai P; Czirják S; Bekő G; Gláz E; Rácz K; Tulassay Z:**
A szomatosztatin analóg kezelés eredményei akromegáliában
ORVOSI HETILAP 150, 1457-1462
2009
46. Reismann P; Likó I; **Igaz P; Patócs A; Rácz K:**
Pharmacological options for treatment of hyperandrogenic
disorders
MINI REV MED CHEM 9, 1113-1126
2009 **IF: 2,971**
47. Gergics P; Patócs A; Tóth M; **Igaz P; Szücs N; Likó I; Fazakas F; Szabó I; Kovács A; Gláz E; Rácz K:**
Germline *VHL* gene mutations in Hungarian families with von
Hippel-Lindau disease and patients with sporadic unilateral
pheochromocytomas
EUR J ENDOCRINOL, 161, 495-502
2009 **IF: 3,539**
48. Butz H; Likó 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 ARCHÍVUM 62, 355-362
2009

49. Gergics P; Tőke J; Szappanos Á; 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, 2258-2264
2009
50. 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
OSTEOPOROS INT 21, 637-645
2010 **IF: 4,859**
51. **Igaz P**; Tulassay Z:
A rhabdomyolysis
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM 63, 25-27
2010
52. Boyle B; Butz H; Likó 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, 695-700
2010 **IF: 3,106**
53. Butz H; Likó 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, E181-E191
2010 **IF: 6,495**
54. Reismann P; Kender Z; Dabasi G; Sréter L; Rácz K; **Igaz P**:
Neuroendokrin daganatok szomatosztatin-receptor
endoradioterápiája: hazai betegeken szerzett tapasztalatok
ORVOSI HETILAP, 152, 392-397
2011

55. Szabó A; **Igaz P**; Kiss R; Lakatos G; Varga I; Rácz K:
Ectopiás ACTH-termelő neuroendokrin daganat. Esetismertetés.
ORVOSI HETILAP, 152, 403-406
2011
56. Raizer G; **Igaz P**; Pregun I; Dabasi G; Rácz K:
Neuroendokrin daganat májmetasztázisainak teljes és tartós
remissziója szomatostatinanalóg-kezelés hatására
ORVOSI HETILAP, 152, 407-410
2011
57. **Igaz P**:
Sunitinib és everolimus a pancreas neuroendokrin daganatainak
kezelésében
ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE, XVIII, 89-91
2011
58. **Igaz P**; Rácz K; Tulassay Z:
Újdonságok a neuroendokrin daganatok gyógyszeres kezelésében
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM, 64, 142-145
2011
59. Sereg M; Tőke J; Patócs A; Varga I; **Igaz P**; Szücs N; Horányi J;
Pusztai P; Czirják S; Gláz E; Rácz K; Tóth M:
Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin
measurements in patients with overt and subclinical Cushing's
syndrome
STEROIDS, 76, 38-42
2011 **IF (2010): 3,106**
60. Butz H; Likó I; Czirják S; **Igaz P**; Korbonits M; Rácz K; Patócs A:
MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway
in sporadic non-functioning pituitary adenomas
PITUITARY, 14, 112-124
2011 **IF (2010): 2,282**

8. A főbb scientometriai adatok összefoglalása:

Folyóiratcikkek száma: 82
(ebből lektorált vagy IF-es teljes terjedelmű cikk: 75)

Az összes folyóiratcikk kumulatív impakt faktora (ΣIF): 92,635

A PhD fokozat (1999) megszerzését követően megjelent közlemények ΣIF -e: 87,277

Az első szerzős impakt faktoros közlemények száma: 13, ΣIF : 29,749

Az utolsó szerzős impakt faktoros közlemények száma: 6, ΣIF : 21,567

Az első és utolsó szerzős folyóiratcikkek kumulatív impakt faktora (ΣIF): 51,316

Összes hivatkozások száma: 370

Független hivatkozások száma: 292

Az első és utolsó szerzős közleményekre született független hivatkozások száma: 226

Hirsch index (klasszikus/csak független hivatkozásokkal számolva): 10/8

Könyvfejezetek száma: 9

9. Köszönetnyilvánítás ^{dc}206_11

Első helyen **Dr. Rácz Károly Professor Úrnak** tartozom köszönettel azért, hogy a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Endokrin Munkacsoportjának vezetőjeként, majd a Klinika igazgatójaként gyógyító- és kutatómunkámban mindvégig támogatott, lehetőséget adott önálló kutatócsoport létrehozására és e munka megírását lehetővé tette. Szintén az elsők között köszönöm **Dr. Tulassay Zsolt Professor Úrnak**, az MTA rendes tagjának, a II. Belgyógyászati Klinika előző igazgatójának, aki a Klinikára végzésemet követően felvett és szintén mindig támogatott.

Köszönettel tartozom **Dr. Falus András Professor Úrnak**, a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet igazgatójának, az MTA rendes tagjának, aki PhD témavezetőmként önálló kutatóvá válásomban, a tudományos gondolkodás elsajátításában alapvető szerepet játszott. A PhD fokozat megszerzése óta is számos közös közleményünk jelent meg és több közös kutatási projektünk van jelenleg is folyamatban. Kutatói pályafutásom elindításában nagy szerepe volt **Dr. Csaba György Professor Úrnak**, aki tudományos diákköri hallgatónak az akkori SOTE Biológiai Intézetbe felvett és **Dr. Tóth Sára docens Asszonynak**, aki első témavezetőm volt.

A Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinikán számos kollégának tartozom köszönettel, mindannyiuk nevét nem is tudnám felsorolni. Kiemelném **Dr. Gláz Edit Professor Asszonyt**, akinek meghatározó szerepe volt abban, hogy a klinikai tárgyak közül az endokrinológiát választottam. **Dr. Patócs Attila tudományos munkatárssal** számos közös tudományos munkában vettünk részt. Köszönöm a Klinika valamennyi munkatársának, akik munkám végzésében segítségemre voltak, kiemelve **Dr. Tóth Miklós docens Urat** és TDK témavezetőmet **Dr. Múzes Györgyi docens Asszonyt**.

Külföldi kapcsolataim közül elsősorban **Prof. Rolf Christian Gaillardnak** köszönöm támogatását.

Köszönöm PhD hallgatóimnak, akik nélkül az értekezés nem jöhetett volna létre: két végzett PhD hallgatónak, **Dr. Szabó Péter Mártonnak** és **Dr. Tömböl Zsófiának**, és jelenlegi PhD hallgatóimnak **Szabó Diánának** és **Zsippai Adriennek**.

TDK hallgatóimnak, akik több díjat nyertek közös munkáinkkal. **Végül, de elsősorban szüleimnek, akiknek pályaválasztásomban, orvossá és kutatóvá válásomban meghatározó szerepük volt és munkám végzésében mindvégig támogattak.**